

**Zur Regulation der Lipogenese aus Kohlenhydraten  
in tierischen und menschlichen Geweben**

Claus Kreisel

1977







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555626\\_0071](https://archive.org/details/IA41555626_0071)

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut des  
Städtischen Krankenhauses München-Schwabing

Direktor: Professor Dr. med. Otto Wieland

Zur Regulation der Lipogenese aus Kohlenhydraten  
in tierischen- und menschlichen Geweben.

Ingaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Claus Kreisel

aus

Neuses

Jahr

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

|                     |                         |
|---------------------|-------------------------|
| Berichterstatter    | Priv. Doz. Dr. L. Weiss |
| Mitberichterstatter | Prof. Dr. H. Fritz      |
| Dekan               | Prof. Dr. W. Spann      |

Tag der mündlichen Prüfung 29. 3. 1977



## I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

- 1.0 Einleitung
- 2.0 Experimenteller Teil
  - 2.1 Versuchstiere und Fütterung
  - 2.2 Tötung und Organentnahme
  - 2.3 Einfluß der Organentnahmetechnik auf den Interconvertierungsgrad der Pyruvatdehydrogenase
  - 2.4 Herstellung der Fett- und Leberhomogenate
  - 2.5 Testsystem zur Bestimmung der Pyruvatdehydrogenaseaktivität
  - 2.6 Bestimmung der ATP:Citratlyaseaktivität
  - 2.7 Bestimmung der Glutamatdehydrogenaseaktivität
  - 2.8 Proteinbestimmung
  - 2.9 Reagenzien und sonstige Materialien
- 3.0 Ergebnisse
  - 3.1 Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere
    - 3.1.1 Pyruvatdehydrogenase Inhibitor
  - 3.2 Abhängigkeit des Interconvertierungsgrades des Pyruvatdehydrogenasekomplexes vom Fütterungszustand der Ratten verschiedener Altersgruppen
  - 3.3 Veränderung des Interconvertierungsgrades nach Hunger und Wiederauffütterung
  - 3.4 Aktivitätsbestimmungen der Pyruvatdehydrogenase in unterschiedlichen Fettgeweben
  - 3.5 Messung der Pyruvatdehydrogenase in menschlichen Geweben
- 4.0 Diskussion
- 5.0 Zusammenfassung
- 6.0 Literatur

# ABKÜRZUNGEN

|                    |                                          |
|--------------------|------------------------------------------|
| °C                 | Grad Celsius                             |
| g                  | Gramm                                    |
| mg                 | Milligramm                               |
| GLDH               | Glutamatdehydrogenase                    |
| MDH                | Malatdehydrogenase                       |
| min                | Minute                                   |
| ml                 | Milliliter                               |
| mU                 | Milliunit                                |
| mM                 | Millimolar                               |
| nm                 | Nanometer                                |
| PDH <sub>a</sub>   | Aktiver Pyruvatdehydrogenaseanteil       |
| PDH <sub>tot</sub> | Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase |
| Prot.              | Protein                                  |

## 1.0. Einleitung

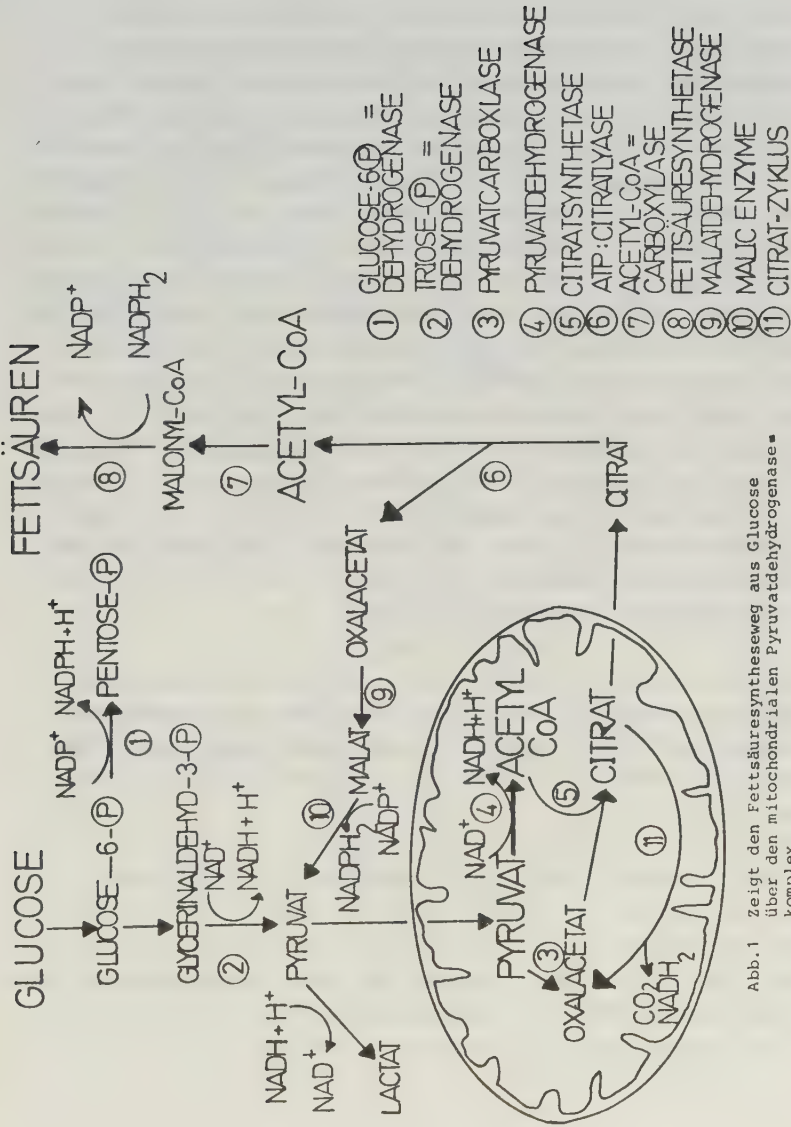
Kohlenhydrate sind eine wesentliche Energiequelle in der Nahrung. Alle verwertbaren Kohlenhydrate -mit Ausnahme der Fructose- werden vor ihrem Eintritt in den Intermediärstoffwechsel in Glucose umgewandelt. Bei normalen Ernährungsbedingungen spielt der Abbau der Glucose über den Glycolyseweg zu Pyruvat bzw. Lactat unter ATP Gewinn und der Abbau über den Hexosemonophosphatzzyklus unter Bildung von  $\text{NADPH}_2$  die größte Rolle. Eine kleine Menge von Glucose wird in Glycogen übergeführt und als solches in Leber und Muskulatur gespeichert. Während in Leber- und Nierengewebe durch eine spezifische Glucose-6-Phosphatase rasch aus den Glycogendepots Glucose an das Blut abgegeben werden kann, findet man in der Muskulatur keine Glucose-6-Phosphatase-Aktivität.

Die Syntheserate von Glycogen spielt bei normalem Ernährungszustand nur eine geringe Rolle im Glucosestoffwechsel; in der Wiederauffütterungsphase nach längerem Hunger ist sie jedoch beträchtlich erhöht (8). Bei einer Glucosezufuhr, die den Energiebedarf übersteigt, wird die nicht benötigte Glucose im Fettgewebe und in anderen Organen zur Synthese von Fettsäuren verwendet und als Triglycerid im Fettgewebe gespeichert. Die Geschwindigkeit der Triglyceridsynthese wie auch die des Triglyceridabbaus wird durch Hormone reguliert. Die wichtigsten sind das Insulin, das die Fettsäuresynthese aus Glucose stimuliert (40, 64) und die Katecholamine, die den Triglyceridabbau fördern. Die Bedeutung des Fettgewebes liegt vor allem in seiner Funktion als Speicherorgan (ein normal ernährter Mann mittlerer Größe hat etwa 90 000 Kcal als Triglyceride gespeichert). Bei Glucosemangel kommt es zur Aktivierung lipolytischer Enzyme, unter deren Wirkung die Triglyceride im Fettgewebe rasch in Glycerin und Fettsäuren gespalten und dann an das Blut abgegeben werden. Während

Glycerin neben Lactat und den glucogenen Aminosäuren als Substrat der Gluconeogenese dienen, können die Fettsäuren im Energiestoffwechsel vieler Gewebe verwertet werden (27,52).

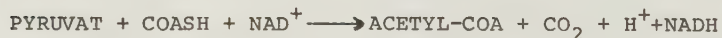
Die eigentliche Fettsäureneusynthese findet im Cytosol vieler Gewebe statt. So hat man den Einbau radioaktiv markierter Glucose in Triglyceride u. a. im Lebergewebe (50) und Fettgewebe nachweisen können (47).

Die Zellmembran der Fettzelle ist nicht frei permeabel für Glucose (24) im Gegensatz zur Leberzellmembran, wo die Glucose durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die Glucoseaufnahme geschieht deshalb in Form eines "erleichterten Transportes". Dabei assoziiert sich die Glucose an einem an der Zellmembran lokalisierten "Glucose-Carrier", von dem sie in der Zelle leicht abdiffundiert. Die Affinität des "Carriers" zur Glucose und die Umsatzgeschwindigkeit ist unter dem Einfluß von Insulin erhöht (38). Es werden fast nur D-Isomere der Glucose transportiert, wobei andere Hexosen nur mit geringer Geschwindigkeit, wenn überhaupt, transportiert werden. Das im Cytosol entstandene Pyruvat muß, um weiter umgesetzt zu werden, in das Mitochondrium aufgenommen werden. Ein spezieller "Pyruvat-Carrier" scheint diese Translocation zu übernehmen (32). Dieser ist aber nicht geschwindigkeitsbestimmend. Intramitochondrial wird dann Pyruvat durch dehydrierende Decarboxylierung im Pyruvatdehydrogenasesystem in Acetyl-CoA überführt. Das intramitochondrial entstandene Acetyl-CoA kann entweder über den Citratzyklus zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NADH}_2$  oxydiert werden oder nach Translocation ins Cytosol für biosynthetische Prozesse genutzt werden (s. Abb. 1). Acetyl-CoA kann die mitochondriale Membran nicht passieren (19). Dagegen kann Citrat, das durch die Reaktion von Acetyl-CoA mit Oxalacetat an der Citratsynthetase entsteht, ins Cytosol translociert werden. Cytosolisch muß es dann durch die ATP: Citratlyase in Acetyl-CoA und Oxalacetat wieder gespalten werden und steht dann der cytosolischen Fettneusynthese zur Verfügung. Beim Transport von



Acetyl-CoA durch die Mitochondrienmembran wird pro Mol Acetyl-CoA 1 Mol ATP verbraucht. Acetyl-CoA wird nun cytosolisch an der Acetyl-CoA-Carboxylase zu Malonyl-CoA übergeführt, das als Substrat für die Fettsäuresynthetase-reaktion dient. Auf diesem Weg entstehen durch schrittweise Kettverlängerung um jeweils eine  $C_2$  Einheit langkettige Fettsäuren mit einer bevorzugten Kettenlänge von 16 - 18 Kohlenstoffatomen. Nach Aktivierung durch eine Thiokinase werden sie zu Acyl-CoA umgewandelt und durch ein mikrosomales Enzymsystem (1, 20) mit  $\alpha$ -Glycerophosphat zur Phosphatidsäure und dann weiter zum Triglycerid verestert. Im Fettgewebe kann Glycerin nicht zur Triglyceridsynthese verwendet werden, da dieses keine Glycerokinaseaktivitäten besitzt (58). Deshalb muß  $\alpha$ -Glycerophosphat aus dem glycolytischen Abbau der Glucose als Akzeptor für Acyl-CoA entnommen werden. Im Gegensatz dazu besitzt die Muskel- und Leberzelle ausreichend Glycerokinaseaktivitäten. Glycerin kann also hier für den Aufbau von Triglyceridglycerin und in Leber und Niere zur Gluconeogenese verwendet werden.

Von ganz besonderer Bedeutung bei der Synthese von Fettsäuren aus Glucose ist im Fettgewebe der Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDH). Er ist im Innenmembran-Matrixraum des Mitochondriums lokalisiert (31, 33) und katalysiert folgende Reaktion.



Der PDH-Komplex (EC 1.2.4.1) hat ein Molekulargewicht von ca. 5 000 000 (18). Er besteht aus drei Untereinheiten. Eine Pyruvatdecarboxylase, eine Dihydrolipoyltransacetylase und eine Dihydrolipoyldehydrogenase (siehe Abb. 2).

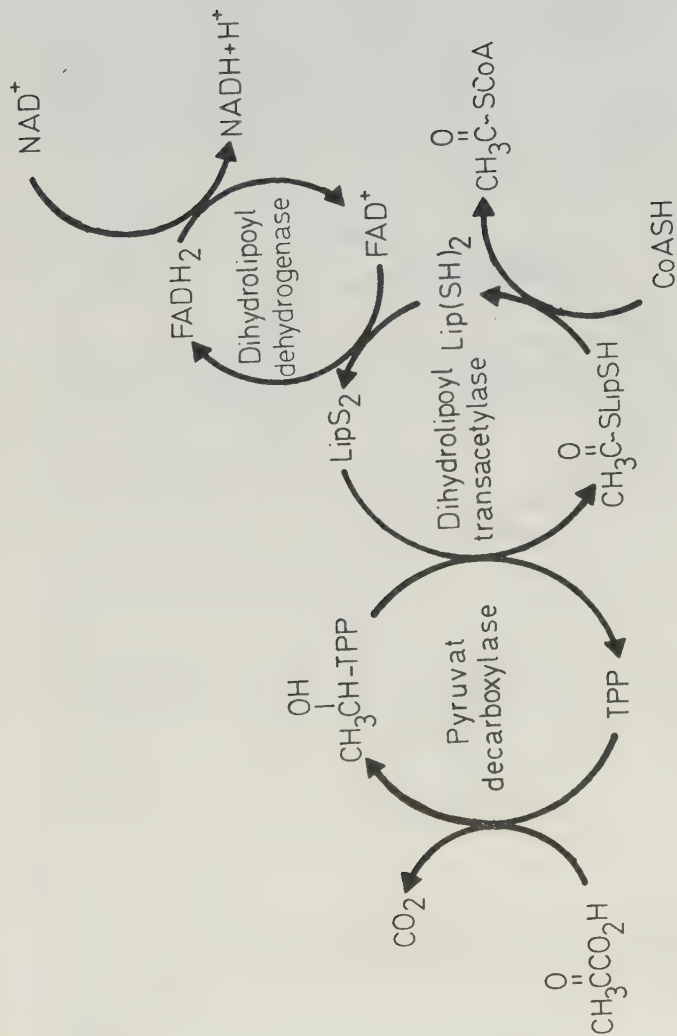


Abb. 2 Einzelschritte der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion

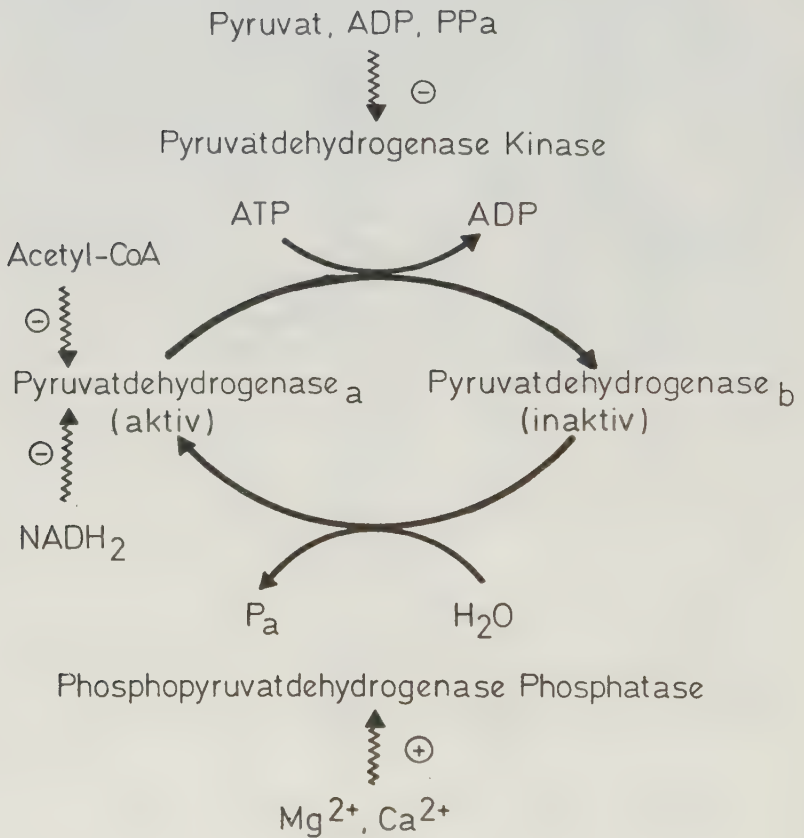


Abb. 3 Modifizierende Enzyme und Effektoren, die auf das Interkonvertierungsgleichgewicht der Pyruvatdehydrogenase wirken.

Nach Untersuchungen, die mit gereinigten Enzymen aus Rindernieren und Rinderherzen durchgeführt wurden, enthält der PDH-Komplex etwa 60 Pyruvatdecarboxylase Untereinheiten (bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette), 60 Transacetylaseketten, aber nur 10 bis 12 Flavoproteinketten (37). Eine Besonderheit dieses Enzymkomplexes liegt darin, daß seine Aktivität reversibel reguliert werden kann (Abb. 3). Durch eine ATP abhängige spezifische Kinase, die mit dem Gesamtkomplex eng assoziiert ist (59, 26), wird ein Serylrest in der Kette des Pyruvatdecarboxylaseanteils ATP abhängig phosphoryliert, wobei die katalytische Aktivität des gesamten Komplexes verloren geht. Umgekehrt wird durch eine spezifische Phosphopyruvatdehydrogenase-Phosphatase, die sich vom Pyruvatdehydrogenasekomplex abtrennen läßt, durch Dephosphorylierung die volle Aktivität wieder zurückgewonnen (25, 26, 42, 62).

Für die Phosphatasereaktion sind millimolare Konzentrationen an  $Mg^{2+}$  nötig (37, 62). Ebenso ist  $Ca^{2+}$  in mikromolaren Konzentrationen als essentieller Cofaktor nötig (62). Die Kinase-reaktion wird durch Pyruvat, ADP und durch anorganisches Phosphat gehemmt (16, 25, 62). Abgesehen von der covalenten Modifizierung liegen weitere Regulationsmöglichkeiten des PDH-Komplexes in einer Rückkopplungshemmung durch Acetyl-CoA (kompetitiv zu COASH) und durch  $NADH_2$  (Abb. 3; 10, 62). Vergleicht man die Aktivitäten des dephosphorylierten Enzymkomplexes, was der aktiven Form, der  $PDH_a$ , entspricht im epididymalen Fettgewebe junger Ratten mit der Geschwindigkeit der Fettsäureneusynthese (53), so findet man eine erstaunlich gute Übereinstimmung. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß der Aktivitätszustand des PDH-Systems eine Schrittmacherfunktion für die Fettsäureneusynthese aus Kohlenhydraten darstellt. Die bisherigen Kenntnisse über die Fettsäuresynthese wurden hauptsächlich in Experimenten am Fettgewebe junger Ratten gewonnen, die nicht mehr als 200 g wogen.

Inwieweit die Ergebnisse auf ältere Ratten oder gar auf den Menschen übertragbar sind ist bisher nur wenig untersucht und in vielem noch unklar. Wie schon RUDMAN und DIGIROLAMO (39) beschrieben, findet sich im Fettgewebe alter Ratten mit einem Gewicht von mehr als 400 g keine oder nur eine geringe Fettsäureneusynthese aus Kohlenhydraten. Ein viel größerer Teil der verstoffwechselten Glucose wird zu Glycerid-Glycerin umgewandelt. Außerdem nimmt die Insulinempfindlichkeit mit zunehmendem Rattenalter ab. Ähnliche Befunde werden auch von menschlichem Fettgewebe berichtet (13).

Die Fettsäureneusynthese scheint also im Gegensatz zur jungen Ratte nicht mehr im Fettgewebe stattzufinden, sondern ist von anderen Organen übernommen worden. Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Aktivitäten des Pyruvatdehydrogenasekomplexes bei Ratten verschiedener Altersklassen unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen im Fettgewebe und Lebergewebe zu bestimmen. Vergleichend zu den Ratten als Studienobjekt soll in menschlichem Leber- und Fettgewebe, anhand der PDH und ATP:Citratlyaseaktivitäten ein Anhalt über die mögliche Lipogenesegeschwindigkeit gewonnen werden.

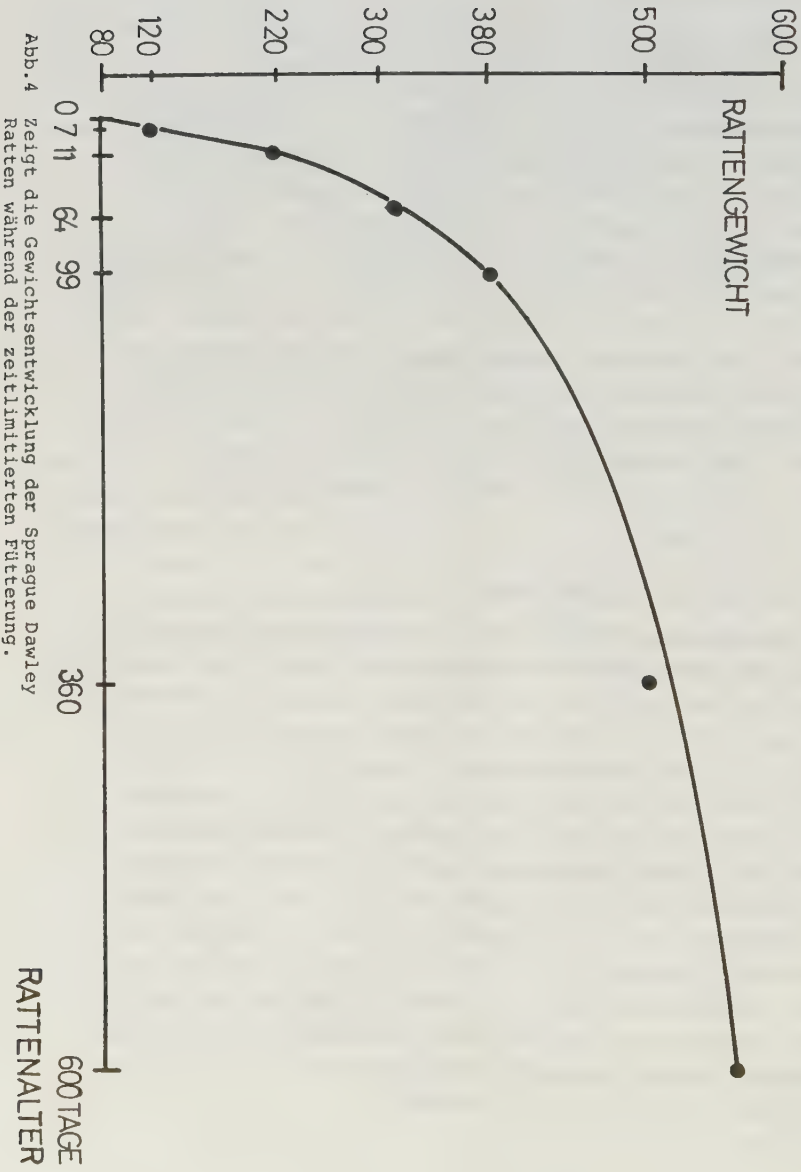
## 2.0. Experimenteller Teil

### 2.1. Versuchstiere und Fütterung

Für alle Untersuchungen wurden männliche Albinoratten (Sprague Dawley) verwendet. Die Tiere wurden mit einem Standardfutter und Wasser gefüttert. Um größere Kollektive unter standardisierten Lebensbedingungen halten zu können, wurden die Tiere entsprechend einem Vorschlag LOWENSTEINS (29), nach einem besonderen Rhythmus gefüttert. Die Tiere wurden von 7.00 - 10.00 Uhr gefüttert, während sie die restlichen 21 Stunden des Tages ohne Futter blieben. So war eine maximale Freßlust innerhalb der 3-stündigen Fütterung gewährleistet. Wasser wurde ad libitum gegeben. Die Tiere wurden schon mit etwa 80 g diesem Rhythmus unterworfen. Nach etwa 8 bis 14 Tagen hatten sie sich an diese Art der Nahrungsaufnahme gewöhnt. (Siehe Abb. 4)

### 2.2. Tötung und Organentnahme

Für die Versuche wurden Gruppen von jeweils 10 Tieren mit einer maximalen Gewichtsschwankung von  $\pm 10$  g ausgewählt. Um den Einfluß einer möglichen Hypoxie im Gewebe auszuschalten, wie sie bei der Dekapitation mit anschließender Gewebeentnahme eintreten könnte (vg. Tab. 1), narkotisierten wir die Tiere mit 0,2 ml/100 g Rattengewicht Nembutal<sup>R</sup> subcutan ins Nackenfettgewebe; bei Entnahme von braunem Fettgewebe subcutan in die Bauchhaut. Nach maximal 30 Minuten reagierten die Tiere nicht mehr auf Schmerzreize. Anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet und vorsichtig das Gewebe entnommen. Das Fettgewebe entnahmen wir aus den proximalen Spitzen des epididymalen Fettgewebes, von der Leber wurde ein kleiner Lappen entfernt. Sofort nach der Entnahme wurden die Proben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.



### 2.3. Einfluß der Organentnahmetechnik auf den Interconversionierungsgrad der Pyruvatdehydrogenase im Lebergewebe.

Um den Einfluß der Tötungsart untersuchen zu können, wurden jeweils 5 Tiere dekapitiert und 5 Tiere mit 0,2 ml/100 g Rattengewicht s.c. narkotisiert. Der Versuch wurde bei 150 g schweren und bei 380 g schweren Ratten durchgeführt.

Tab. 1 Einfluß der Nembutalnarkose und der Dekapitation auf den Interconversionierungsgrad der Pyruvatdehydrogenase. Gemessen wurde im Lebergewebe 150 g und 380 g schwerer Ratten. Die Tiere wurden nach 21 Stunden Hunger 60 Minuten mit Standardfutter aufgefüttert.

|                                           | PDH <sub>a</sub><br>mU/mg Prot.<br>+ s.e.m.<br>$\bar{n} = 5$ | PDH <sub>tot</sub><br>mU/mg Prot.<br>+ s.e.m.<br>$\bar{n} = 5$ | %PDH <sub>a</sub> |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|
| Mit Nembutal <sup>R</sup><br>Ratten 150 g | 0,66<br>± 0,11                                               | 5,26<br>± 0,79                                                 | 12,5              |
| Mit Nembutal <sup>R</sup><br>Ratten 380 g | 0,55<br>± 0,08                                               | 3,96<br>± 0,76                                                 | 13,9              |
| Dekapitation<br>Ratten 150 g              | 1,05<br>± 0,13                                               | 4,41<br>± 1,36                                                 | 23,8              |
| Dekapitation<br>Ratten 380 g              | 0,69<br>± 0,20                                               | 3,26<br>± 0,65                                                 | 21,2              |

Tab. 1 zeigt, daß im Lebergewebe alter und junger Ratten bei Nembutalnarkose die Aktivität der PDH<sub>a</sub> deutlich geringer ist als bei Gewebeentnahme nach Dekapitation. Eine Erklärung für den Anstieg der PDH<sub>a</sub> nach Dekapitation gibt die Hypoxie bei dieser Art der Gewebeentnahme, die zeitabhängig zum Abfall des ATP/ADP Quotienten führt.

Eine solche Veränderung des Nukleotidspiegels würde zu einer Verschiebung des Interconvertierungsgleichgewichtes zur Dephosphoform (aktive Form) führen.

Diese Vorstellung konnte durch Versuche mit Rattenlebern, die unterschiedlich langer Hypoxie ausgesetzt wurden, bestätigt werden (43).

Alle Gewebeentnahmen wurden deshalb in Nembutalnarkose durchgeführt.

#### 2.4. Herstellung der Fett- und Leberhomogenate

Um störende Lipide im Fettgewebe abtrennen zu können und um kleinere Gewebeproben aufschließen zu können, wurde eine spezielle Siliconöltechnik (53) verwendet. Abb. 5 zeigt einen Fettgewebeaufschluß. Durch die Siliconölschicht (spezifisches Gewicht  $0,95 \text{ g/cm}^3$ ) ist die Triglyceridphase vom wässrigen Fettgewebeextrakt völlig getrennt. In der Zwischenschicht findet sich keinerlei PDH-Aktivität, Lipide sind nicht nachweisbar. Im Lebergewebeaufschluß findet man eine ähnliche Schichtung. Die Messungen der PDH-Aktivitäten wurden in der fettfreien, wässrigen Phase (Homogenat) durchgeführt.

Das nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Gewebe wird in einem kleinen Porzellanmörser unter flüssigem Stickstoff zerkleinert, in entsprechende Portionen aufgeteilt und in Polystyrolröhrchen unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Aufschließen wird die Gewebeprobe mit Pufferlösung und Siliconöl AK 20 überschichtet.

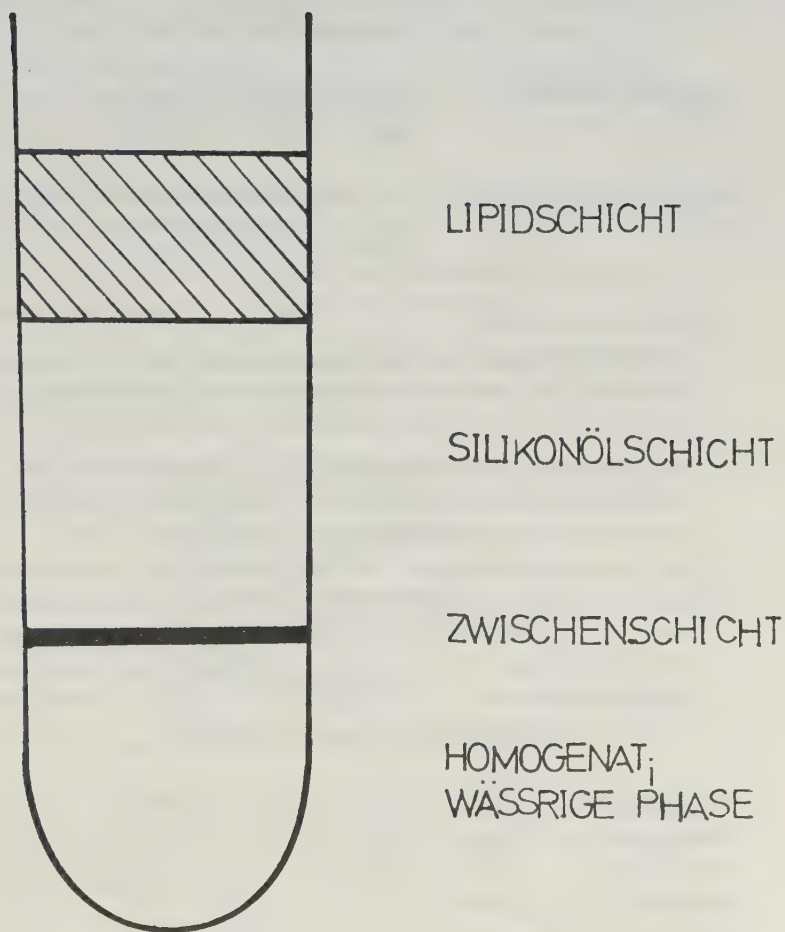


Abb.5    Fraktionen eines Fettgewebeaufschlusses  
mit der Siliconöltechnik.

|                  |                                                                                      |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Aufschlußmedium: | 15,0 mM Tris PH 7,0<br>0,2 % Lubrol <sub>1</sub><br>1,0 % Schutzprotein <sub>2</sub> |
| Gewebsaufschluß: | ca. 100 mg Gewebe                                                                    |
| Leber            | 1000 µl Aufschlußmedium<br>6000 µl Siliconöl AK 20                                   |
| Gewebsaufschluß: | ca. 200 mg Gewebe                                                                    |
| Fett             | 500 µl Aufschlußmedium<br>3000 µl Siliconöl AK 20                                    |

- 
- 1) Durch den Zusatz von Lubrol gelang es die maximale Aktivität an Pyruvatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase aus den Mitochondrien zu extrahieren.
  - 2) Der Pyruvatdehydrogenasekomplex in Homogenaten aus Mitochondrien wird rasch durch eine Verunreinigung mit einer lysosomalen Protease inaktiviert (60). Ein Proteaseinhibitor, der im Cytosol der Rattenleber, aber auch in hoher Aktivität im Rattenserum, gefunden wird, kann den Abfall der Pyruvatdehydrogenaseaktivität verhindern. Zur Sicherheit wurden daher allen Gewebeaufschlüssen 1 % Rattenserum als Stabilisator des Pyruvatdehydrogenasekomplexes zugesetzt.

Anschließend homogenisiert man mit einem hochoberigen Homogenisator (Ultraturrax TP 10 Firma Jahnke und Kunkel, Stauffen/Br.) 2 mal 25 Sekunden mit mindestens 25 Sekunden Unterbrechung in einem Polystyrolröhrchen, das in einem Kältebad von ca. -5°C steht (Eis und NaCl-Gemisch). Es ist darauf zu achten, daß die Temperatur im Homogenat nicht über +5°C ansteigt. Anschließend wird der Aufschluß in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße abgefüllt und 1,5 Minuten bei 10 000 g in der Eppendorf-Zentrifuge bei 0°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird vorsichtig mit einer Kanüle abgesaugt und in ein auf 0°C vorgekühltes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das überführte Homogenat wird

anschließend nochmals für etwa 10 Sekunden bei 10 000 g zentrifugiert, um Spuren mitgeschleppten Siliconöls klar abzuschcheiden. Menschliche Leberpunktionszylinder mit 10 bis 20 mg Gewicht wurden in 250  $\mu$ l Aufschlußmedium und 3 ml Siliconöl homogenisiert und in üblicher Weise weiterbehandelt.

## 2.5. Testsystem zur Bestimmung der Pyruvatdehydrogenaseaktivität.

Die PDH-Aktivitäten in Leber- und Fettgewebe wurden mit geringen Modifikationen nach (63) bestimmt.

Im Testsystem mit einem Endvolumen von 250  $\mu$ l waren folgende Substanzen enthalten.

- 25 mM Tris Puffer, PH 8
- 0,15 mM para-Nitroanilin
- 1 mM  $\text{NAD}^+$
- 1 mM Thiaminpyrophosphat
- 10 mM Merkaptoäthanol
- 20 mM Na-Pyruvat
- 10  $\mu$ g Lactatdehydrogenase
- 25 mU Arylaminacetyltransferase
- 0,4 mM  $\text{MgCl}_2$
- 0,1 mM CoASH
- 50  $\mu$ l Gewebehomogenat

Die Reaktion wurde mit 0,1 mM CoASH gestartet.

Bei der Messung der  $\text{PDH}_a$  im Lebergewebe gab es einen Vorlauf, der rasch linear wurde. Dieser wurde durch Extrapolation berücksichtigt. Die Reaktion wurde in einem Eppendorf Spektralphotometer bei 405 nm und 25°C verfolgt. Gemessen wurde die Abnahme der Absorption von Paranitroanilin im Verlauf der Acetylierung zu Paranitroacetanilid. Dabei entspricht die Bildung von 1 nMol Paranitroacetanilid pro Minute bei 25°C der Aktivität von 1 mU  $\text{PDH}_a$ . Mit dem oben beschriebenen Testsystem wurde die aktive Dephosphoform,  $\text{PDH}_a$ , gemessen. Zur Messung der Totalaktivitäten mußte das Homogenat für 10 Minuten bei 25°C vorinkubiert werden. Während der Vorinkubation befand sich im Homogenat 10 mM

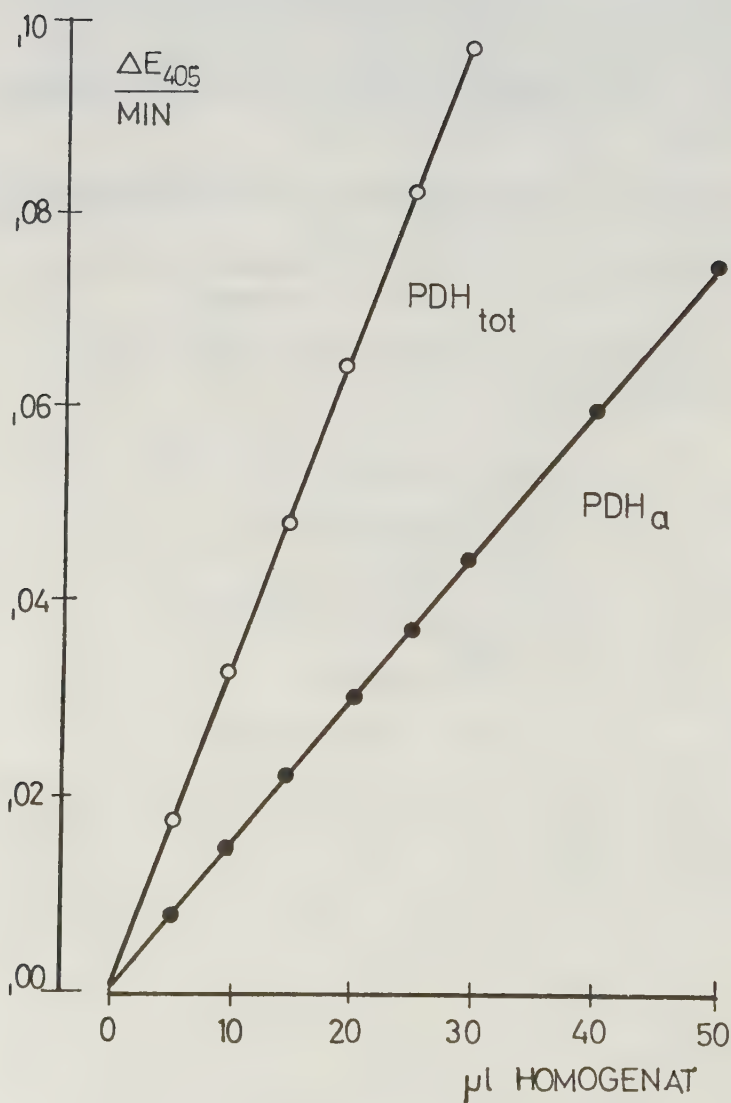
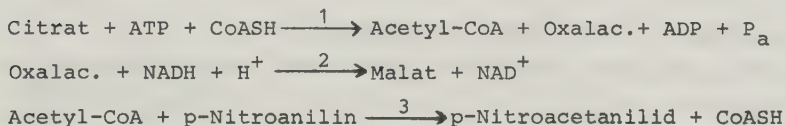


Abb.6 Zeigt die Abhängigkeit der Extinktionsänderung des Pyruvatdehydrogenasemessystems vom Homogenateinsatz.

MgCl<sub>2</sub> und 12 µg Phosphopyruvatdehydrogenasephosphatase. Durch diese Behandlung wurde der Anteil an phosphorylierter, inaktiver PDH (PDH<sub>p</sub>) in die aktive Dephosphoform übergeführt und dadurch meßbar.

## 2.6. Bestimmung der ATP: Citratlyase

Die ATP:Citratlyase katalysiert die CoA-SH und ATP abhängige Spaltung von Citrat. Die Aktivitätsbestimmungen wurden mit folgendem Testsystem durchgeführt.



- |                              |                |
|------------------------------|----------------|
| 1) ATP:Citratlyase           | E.C. 4.1.3.8.  |
| 2) Malatdehydrogenase        | E.C. 1.1.1.37. |
| 3) Arylaminacetyltransferase | E.C. 2.3.1.5.  |

Wie bei der Aktivitätsbestimmung der PDH wurde die Abnahme der Absorption von Paranitroanilin bei 405 nm und 25°C beobachtet. Der Vorteil dieses Testsystems gegenüber der von SRERE (44) beschriebenen Bestimmungsmethode liegt darin, daß auch in rohen Gewebehomogenaten gemessen werden kann, da eine unspezifische Oxydation von NADH<sub>2</sub> bei einer Meßwellenlänge von 405 nm nicht störte. Auf den Zusatz von MDH (Malatdehydrogenase), um das Reaktionsprodukt Oxalacetat zu entfernen, konnte man verzichten, da in den Gewebeaufschlüssen MDH (Malatdehydrogenase) Aktivität im Überschuß vorhanden war.

Im Testsystem waren in einem Endvolumen von 250  $\mu$ l folgende Substanzen enthalten.

40 mM Tris Puffer PH 7,6  
8 mM  $MgCl_2$   
0,1 mM CoASH  
22,4 mM Na-Citrat  
0,3 mM NADH  
0,15 mM p-Nitroanilin  
10 mM Merkaptoäthanol  
8 mM ATP  
25 mU Arylaminacetyltransferase  
10  $\mu$ l Homogenat

Die Reaktion wurde mit ATP gestartet.

Dabei entspricht die Bildung von 1 nMol Paranitroacetanilid pro Minute bei 25°C der Aktivität von 1 mU ATP:Citratlyase.

Den Effekt der Einzelkomponente auf den ATP:Citratlyase-Test zeigt Tab. 2.  $MgCl_2$ , ATP, Citrat, CoA-SH und Arylaminacetyltransferase stellten sich als essentielle Zusätze heraus.

Tab. 2 Effekt der Einzelkomponenten im ATP:Citratlyase Testsystem

| Fehlend im Testsystem     | $\Delta E/\text{min.}$ |
|---------------------------|------------------------|
| nichts                    | 0,051                  |
| $MgCl_2$                  | 0,00                   |
| Merkaptoäthanol           | 0,039                  |
| Citrat                    | 0,00                   |
| NADH                      | 0,045                  |
| CoA-SH                    | 0,00                   |
| ATP                       | 0,00                   |
| Arylaminacetyltransferase | 0,00                   |

Die Abhängigkeit des Citratumsatzes von der eingesetzten Homogenatmenge zeigt Abb. 7. Der Einfluß der CoA-SH, ATP, Citrat und  $MgCl_2$ -Konzentration auf die ATP:Citratlyase-aktivität ist in Abb. 8, 8a bzw. 9, 9a dargestellt.

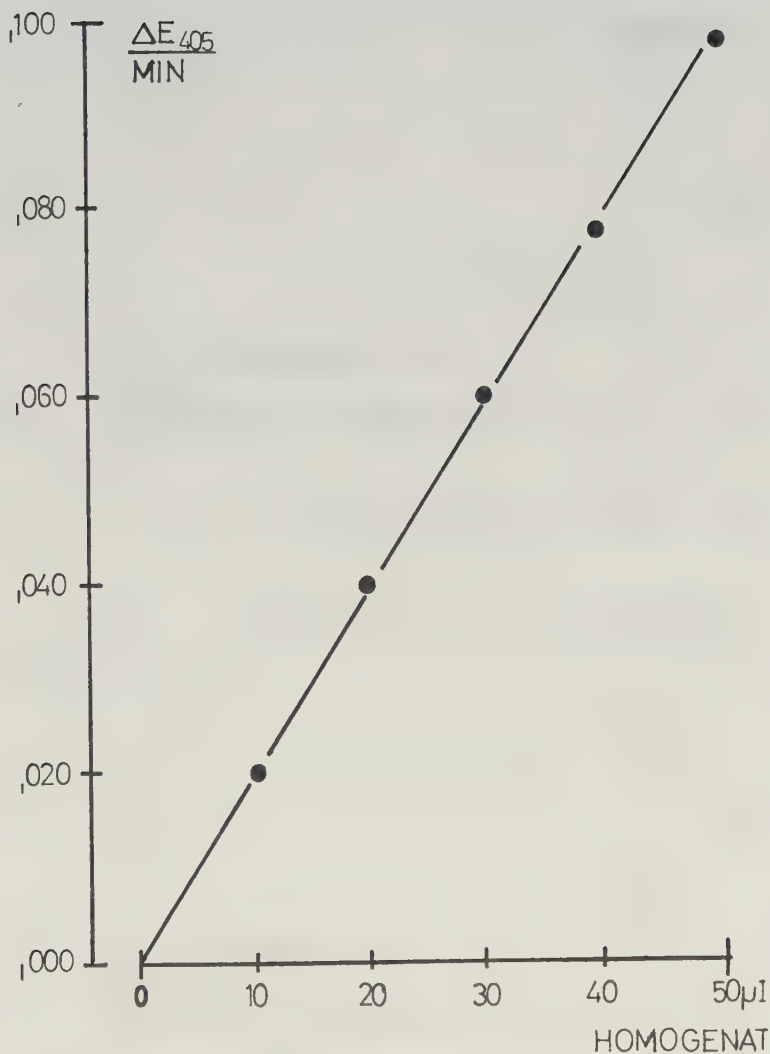


Abb. 7 Abhängigkeit der Citratlyaseaktivität vom Einsatz der Enzymmenge. Eine ca. 10-fach über die Ausgangsaktivität angereicherte Enzympräparation wurde für den Test verwendet.

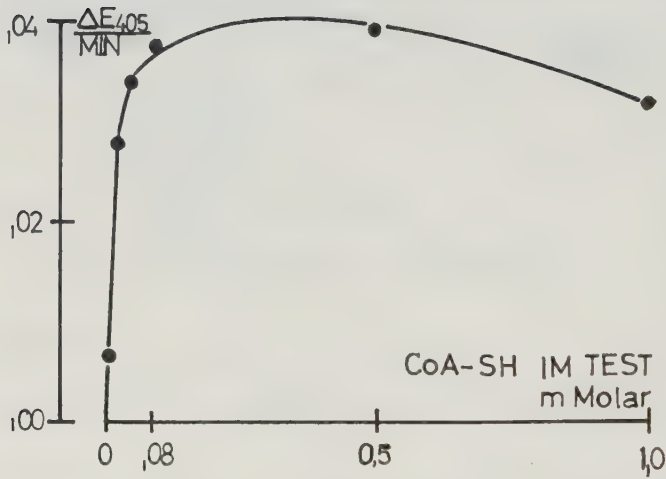


Abb. 8 Abhängigkeit der ATP:Citratlyaseaktivitäten von der Konzentration an CoA-SH.

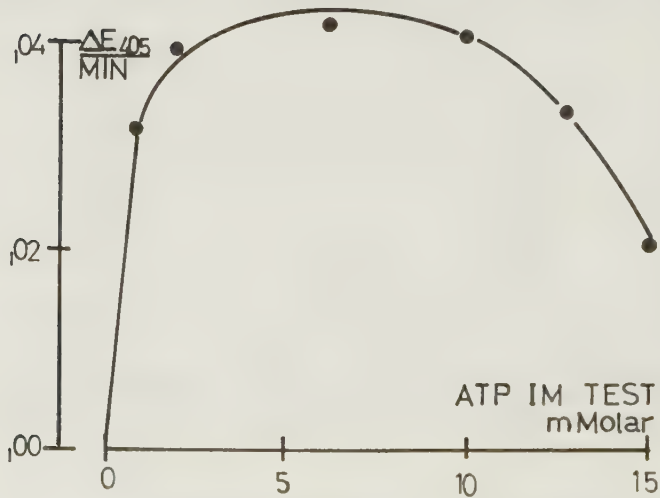


Abb. 8a Abhängigkeit der ATP:Citratlyaseaktivitäten von der Konzentration an ATP im Test.

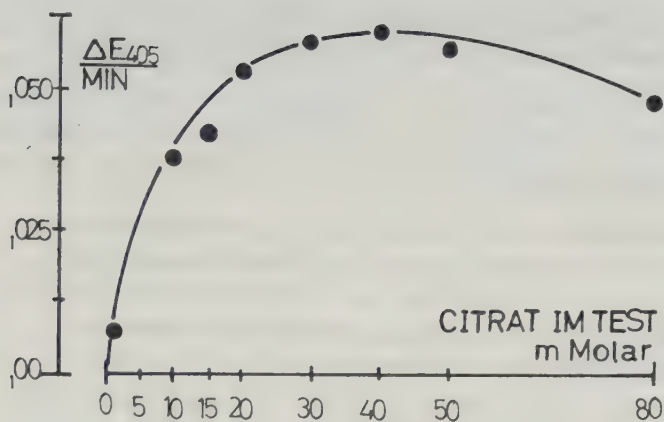


Abb. 9 Abhängigkeit der ATP:Citratlyaseaktivitäten von der Konzentration an Citrat.

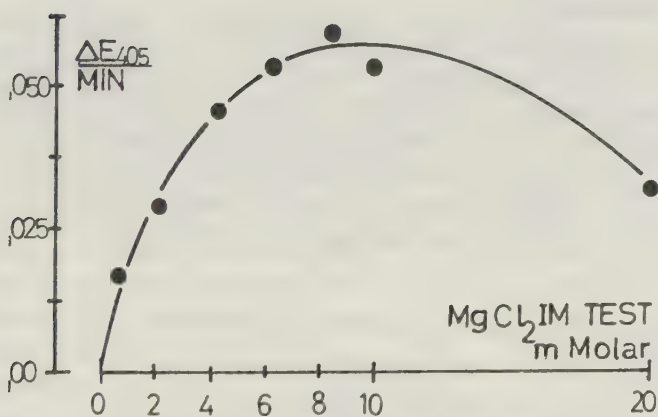


Abb. 9a Abhängigkeit der ATP:Citratlyaseaktivitäten von der Konzentration an  $\text{MgCl}_2$ .

2.7. Die Glutamatdehydrogenaseaktivitäten (GldH) der Gewebeproben wurden mit ADP als Aktivator nach (2) bestimmt.

## 2.8. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt in den lipidhaltigen Gewebeaufschlüssen wurde mit der Biuretreaktion in Modifikation nach (53) bestimmt. Bis zu 0,2 ml wässriger, proteinhaltiger Extrakt wurden durch den Zusatz von 1,0 ml Dioxan enteweißt. Nach zweiminütigem Zentrifugieren in einer Eppendorf-Zentrifuge (ca. 10.000 xg) wurde der Dioxanüberstand abgossen und das Präzipitat nochmals mit 1ml Dioxan resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jetzt wurde das Präzipitat mit 1 ml 0,3 M Trichloressigsäure resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand ebenfalls verworfen. Der Niederschlag wurde dann in 1 ml Biuret-Reagenz gelöst und der entstehende Farbkomplex wie üblich bei 546 nm gemessen.

(Durch die Dioxanbehandlung wurden störende Lipide völlig aus dem Niederschlag entfernt; für lipidärmere Homogenate genügt eine einmalige Dioxanbehandlung. Durch die anschließende Behandlung mit Trichloressigsäure bleibt zwar das denaturierte Protein ungelöst jedoch werden andere Stoffe, die in Dioxan unlöslich waren, durch die wässrige Trichloressigsäure wieder in Lösung gebracht und entfernt.)

## 2.9. Reagenzien und sonstige Materialien

Lubrol Charge 12 A 9, ICI GmbH (Frankfurt).

Siliconöl AK 20 Firma Wacker (Burghausen).

Arylaminacetyltransferase wurde nach TABOR et al. (51) modifiziert nach WIELAND et al. (63) präpariert. Phospho-Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase war ein Geschenk von E.A. Siess (Forscherguppe Diabetes, München).

Das Enzym war aus Schweineherzmuskel unter Weglassen der Schritte 6 und 8 der Originalvorschrift (45) etwa 200-fach angereichert worden. Es wurde im lyophilisierten Zustand

bei  $-30^{\circ}$  C aufbewahrt.

Alle anderen Chemikalien waren Produkte der Firma E. Merck AG (Darmstadt, Germany) und alle Biochemikalien von Boehringer Mannheim GmbH.

Labortierfutter 57 Z bezogen wir von Jakob Zahn II, Hockenheim (Germany). Die männlichen Sprague-Dawley-Ratten erhielten wir von der Firma WIGA, Sulzfeld.

### 3.0. Ergebnisse

#### 3.1. Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere.

Unsere Untersuchungen wurden im epididymalen Fettgewebe und im Lebergewebe durchgeführt. Zunächst führten wir Messungen an Ratten durch, die etwa 30 Minuten nach einer dreistündigen Freßperiode zum Versuch kamen (postprandiale Werte). Wir konnten davon ausgehen, daß bei den untersuchten Tieren nach einer dreistündigen Nahrungsaufnahme ein maximales Glucoseangebot an der Zelle bei maximal gesteigerter Insulinsekretion vorhanden war.

Wie Abb. 10 und 11 zeigen fanden wir im epididymalen Fettgewebe in den ersten beiden Altersklassen Gesamtaktivitäten zwischen 8 und 10 mU/mg Protein, wobei postprandial der Anteil der Pyruvatdehydrogenase<sub>a</sub> ca. 80 % betrug. Bei Tieren mit einem Gewicht von 380 g und mehr hingegen fanden wir nur noch ca. 15 % der Gesamtaktivitäten, die wir in den ersten beiden Gruppen fanden. Die postprandiale Aktivität an Pyruvatdehydrogenase<sub>a</sub> war bei den alten Tieren mit 26 % wesentlich geringer. Bei Bezug auf mg Frischgewicht waren die Aktivitäten bereits bei den 220 g schweren Ratten erniedrigt, was wohl auf einen vermehrten Triglyceridanteil am Frischgewicht zurückzuführen ist. Die spezifischen Aktivitäten in dieser Altersgruppe hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Wie Abb. 12 und 13 zeigen ändert sich im Lebergewebe der untersuchten Altersklassen bis 500 g Tiergewicht wenig in

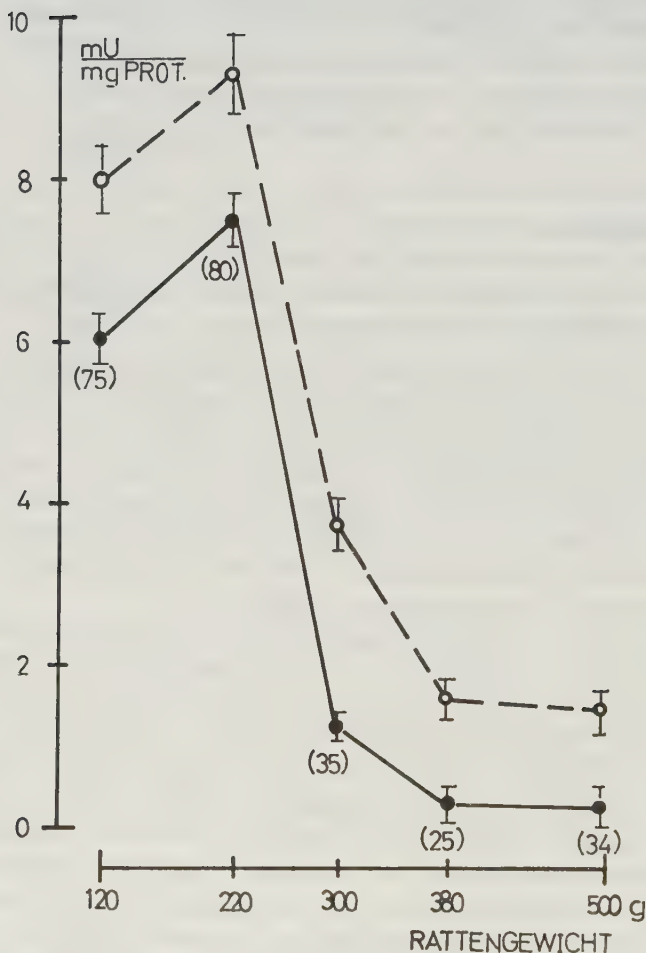


Abb. 10 Darstellung der postprandialen Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten im epididymalen Rattenfettgewebe verschiedener Altersklassen. Gruppen von je 10 Tieren wurden nach einer drei stündigen Freßperiode in Nembutalnarkose getötet und das Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die offenen Kreise (○—○) stellen die Gesamtaktivitäten, die geschlossenen Kreise (●—●) den aktiven Anteil (PDH) dar. In Klammern sind die Prozente der PDH an der Gesamtaktivität angegeben. Mittelwert  $\pm$  s.e.m. n=10

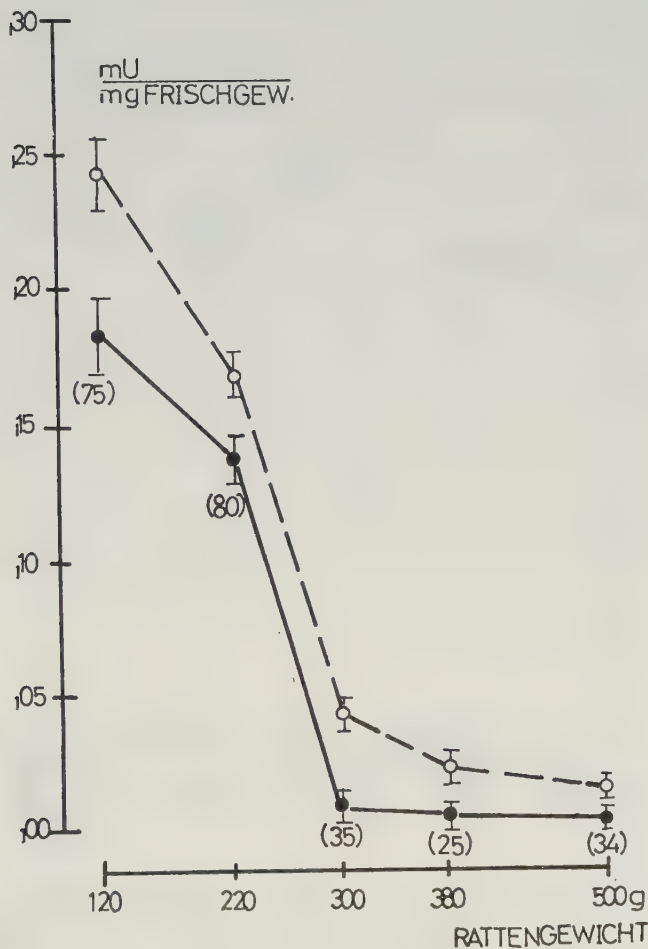


Abb. 11 Darstellung der postprandialen Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten im epididymalen Rattenfettgewebe verschiedener Altersklassen bezogen auf mg Frischgewicht. Offene Kreise (O—O) stellen die Gesamtaktivitäten, geschlossene Kreise (●—●) den aktiven Anteil,  $\text{PDH}_a$ , dar. In Klammern sind die Prozente der  $\text{PDH}_a$  an der Gesamtaktivität angegeben. Mittelwert  $\pm$  s.e.m. n=10.

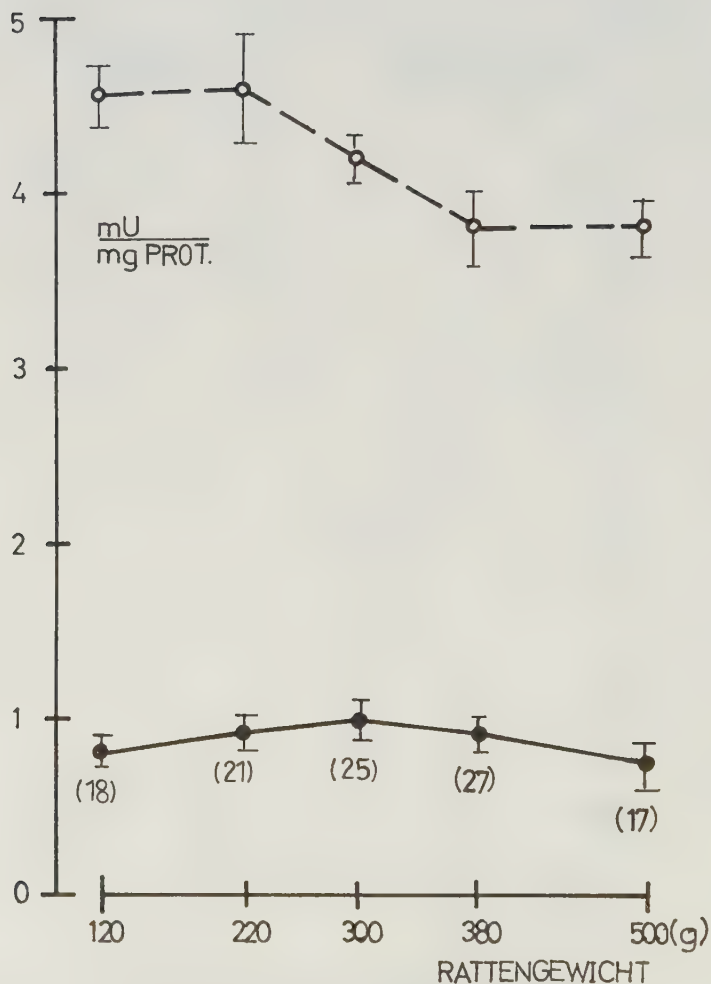


Abb. 12 Darstellung der postprandialen Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten im Rattenlebergewebe verschiedener Altersklassen. Offene Kreise (O--O) stellen die Gesamtaktivitäten, geschlossene Kreise (●--●) den aktiven Anteil,  $PDH^a$ , dar. In Klammern sind die Prozente der  $PDH^a$  an der Gesamtaktivität angegeben. Mittelwert  $\pm$  s.e.m. n=10.

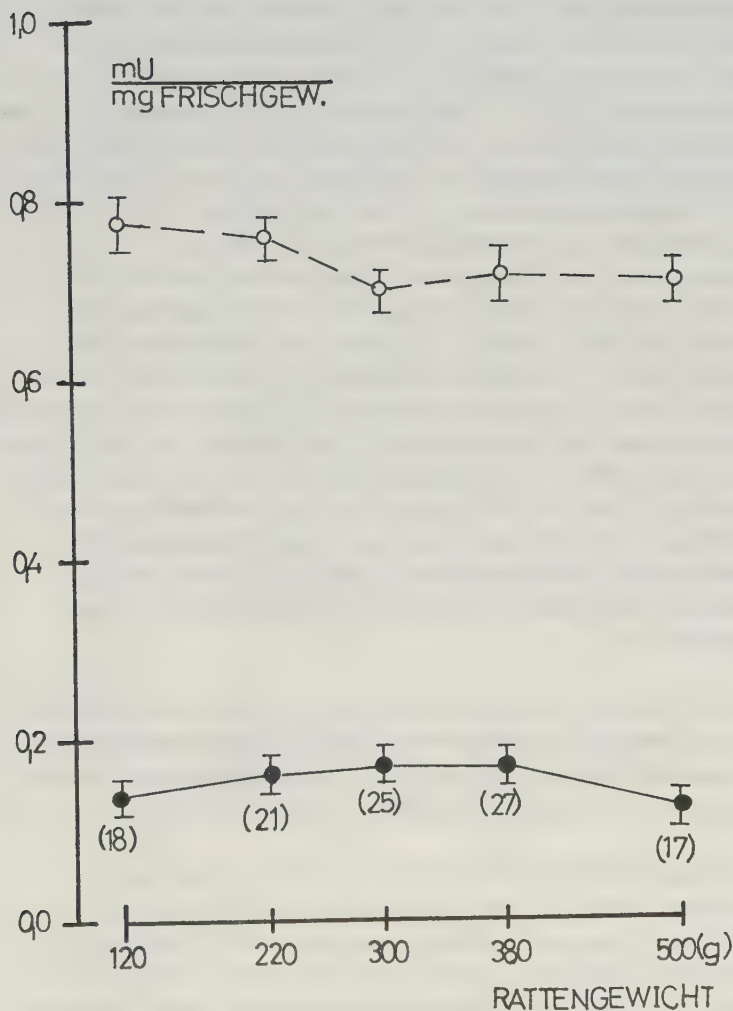


Abb. 13 Darstellung der postprandialen Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten im Rattenlebergewebe verschiedener Altersklassen bezogen auf mg Frischgewicht. Symbole siehe Abb. 12.

den Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase, sowohl bei der spezifischen Aktivität als auch bezogen auf mg Frischgewicht. Die aktive Form, die Pyruvatdehydrogenase<sub>a</sub> war postprandial mit Werten um 20 % der Gesamtaktivität und Schwankungen um  $\pm 5$  % recht konstant. Die Gesamtaktivitäten, nach Dephosphorylierung durch Inkubation mit Phosphatase gemessen, waren ebenso wie die spontanen Enzymaktivitäten mit Pyruvatdehydrogenase<sub>tot</sub> 4 mU/mg Protein und Pyruvatdehydrogenase<sub>a</sub> 1 mU/mg Protein relativ gering. Messungen der Aktivität der Glutamatdehydrogenase (GldH) -einem ausschließlich mitochondrial lokalisierten Enzym- ergaben wie Tab. 3 zeigt, in Fett und Lebergewebe keine wesentlichen Unterschiede zwischen den jungen und alten Ratten. Ebenso wie die Glutamatdehydrogenase ist die Pyruvatdehydrogenase nur mitochondrial lokalisiert. Da die spezifische Aktivität der Glutamatdehydrogenase im Alter kaum vermindert ist, ist der Verlust an Pyruvatdehydrogenase Aktivität im Alter nicht auf eine Verminderung der Mitochondrienzahl zurückzuführen. Dies zeigt deutlich der Quotient  $\text{PDH}_a/\text{GldH}$ , der bei alten Ratten auf 1/10 erniedrigt ist.

Die Bildung von Acetyl-CoA durch die Pyruvatdehydrogenase ist ein ~~essen~~ essentieller Schritt in der Fettsäuresynthese aus Kohlenhydraten. Die eigentliche Fettsäuresynthese jedoch wird durch im Cytosol lokalisierte Enzym katalysiert. (S.Abb.1)

In diesem Zusammenhang ist die ATP:Citratlyase von besonderem Interesse, denn sie spaltet das im Mitochondrium aus Acetyl-CoA und Oxalacetat entstandene Citrat extramitochondrial wieder in Oxalacetat und Acetyl-CoA, das als Substrat in der cytosolischen Fettsäuresynthese verwendet wird. Aktivitätsmessungen, die bei denselben Tieren durchgeführt wurden, zeigten, daß die spezifische Aktivität der ATP:Citratlyase im Fettgewebe junger Ratten 2-3 mal höher war als der aktive Anteil der Pyruvatdehydrogenase. Bei den alten Ratten aber zeigte sich eine starke Verminderung der ATP:Citratlyase vergleichbar zu dem starken Abfall der

POSTPRANDIALE AKTIVITÄTEN DER GLUTAMATDEHYDROGENASE, PYRUVATDEHYDROGENASE<sub>a</sub> UND  
ATP: CITRAT-LYASE IM FETTGeweBE UND LEBERGeweBE VON RATTEN VERSCHIEDENER ALTERSGRUPPEN.

Die Aktivitäten der Glutamatdehydrogenase, der Pyruvatdehydrogenase und der  
ATP: Citrat-Lyase sind in mE (=nMol NAD<sup>+</sup> bzw. Acetyl-CoA gebildet pro Minute)  
pro mg Protein bei 25° C  $\pm$  s.e.m. ausgedrückt.

|                                 | GLDH<br>mE/mg Prot<br>$\pm$ s.e.m.<br>$\bar{n} = 10$ | PDH <sub>a</sub><br>mE/mg Prot<br>$\pm$ s.e.m.<br>$\bar{n} = 10$ | ATP:CL<br>mE/mg Prot<br>$\pm$ s.e.m.<br>$\bar{n} = 5$ | PDH <sub>a</sub><br>GLDH |
|---------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|
| Leber<br>(Ratte 120 g)          | 2190 $\pm$ 70                                        | 0,78 $\pm$ 0,02                                                  | 0,74 $\pm$ 0,09                                       | 4 x 10 <sup>-4</sup>     |
| Leber<br>(Ratte 380-500 g)      | 1740 $\pm$ 110                                       | 0,87 $\pm$ 0,03                                                  | 0,4 $\pm$ 0,05                                        | 5 x 10 <sup>-4</sup>     |
| Fettgewebe<br>(Ratte 120 g)     | 102 $\pm$ 4                                          | 6,05 $\pm$ 0,36                                                  | 15,74 $\pm$ 1,48                                      | 59 x 10 <sup>-3</sup>    |
| Fettgewebe<br>(Ratte 380-500 g) | 85 $\pm$ 6                                           | 0,41 $\pm$ 0,04                                                  | 0,38 $\pm$ 0,05                                       | 5 x 10 <sup>-3</sup>     |

Pyruvatdehydrogenase<sub>a</sub> (siehe Tab. 3). Dies macht deutlich, daß im Fettgewebe alter Ratten die intramitochondriale Acetyl-CoA Synthese aus Pyruvat ebenso wie die cytosolische Bereitstellung vermindert sein muß und deshalb eine de novo Fettsäuresynthese aus Glucose im Fettgewebe alter Ratten nur noch mit geringer Geschwindigkeit ablaufen kann (55,56). Im Lebergewebe waren die ATP:Citratlyaseaktivitäten ebenso wie die der PDH<sub>a</sub> in den Tieren verschiedener Altersgruppen kaum verändert. (Tab. 3)

3.1.1. Um das Vorhandensein eines eventuellen Inhibitors des Pyruvatdehydrogenase-Enzymkomplexes ausschließen zu können, mischten wir Fettgewebshomogenate einer alten und einer jungen Ratte. Dabei erhielten wir, wie Tab. 4 zeigt, die errechneten Enzymaktivitäten. Bei Vorhandensein eines Inhibitors bei alten Ratten hätten die Enzymaktivität des gemischten Homogenates deutlich vermindert sein müssen.

Tab. 4 Mischung eines Fettgewebshomogenates einer jungen (200 g) und einer alten (380 g) Ratte.

|             | Ausgangsaktivität | Mischung 1:1     |                 |
|-------------|-------------------|------------------|-----------------|
|             | ΔE/min            | ΔE/min errechnet | ΔE/min gemessen |
| Junge Ratte | 0,078             | 0,041            | 0,041           |
| Alte Ratte  | 0,004             |                  |                 |

3.2. Abhängigkeit des Interkonvertierungsgrades des Pyruvatdehydrogenasekomplexes vom Fütterungszustand der Ratten verschiedener Altersgruppen.

Es wurden Tiergruppen untersucht, die 24, 48 Stunden nach einer dreistündigen Freßperiode getötet wurden. Wie Abb.14 zeigt lagen im Lebergewebe in allen Altersklassen die Gesamtaktivitäten der Pyruvatdehydrogenase der 24 und 48 Stunden Hungertiere ähnlich hoch wie im postprandialen Zustand. Die

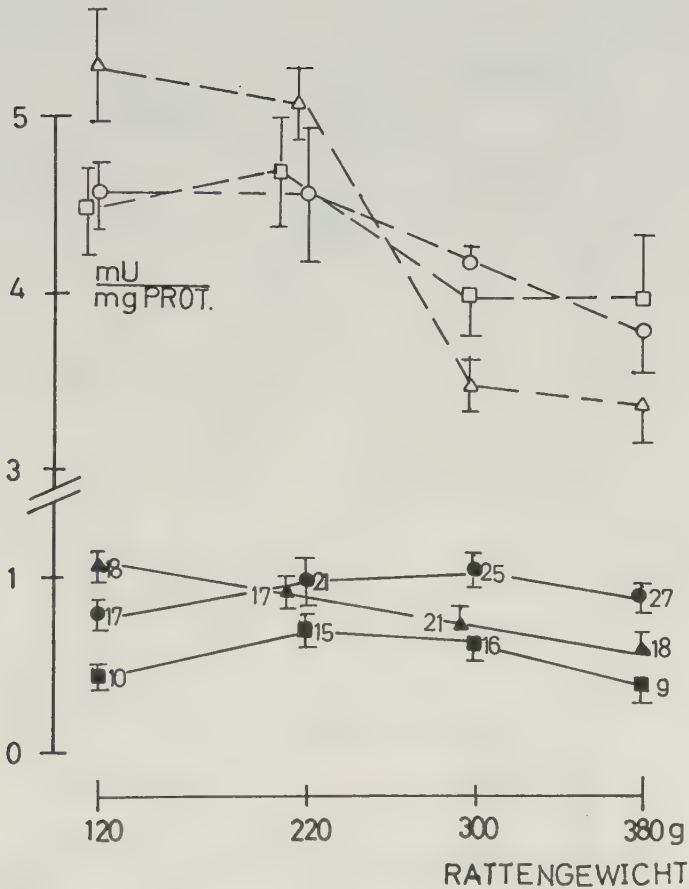


Abb.14 Darstellung der Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten im Rattenlebergewebe postprandial bzw. nach 24 und 48 Stunden Hungerphasen. Offene Symbole (O-O) stellen die Gesamtaktivitäten,  $PDH_{tot}$ , geschlossene Symbole (●-●) den aktiven Anteil,  $PDH_a$ , dar. Die Zahlen neben den Symbolen geben den prozentualen Anteil der  $PDH_a$  an der Gesamtaktivität an. Mittelwert  $\pm$  s.e.m. <sup>a</sup> n=10.

○—○ Postprandiale Aktivität  
 □—□ 24 Stunden Hunger  
 △—△ 48 Stunden Hunger

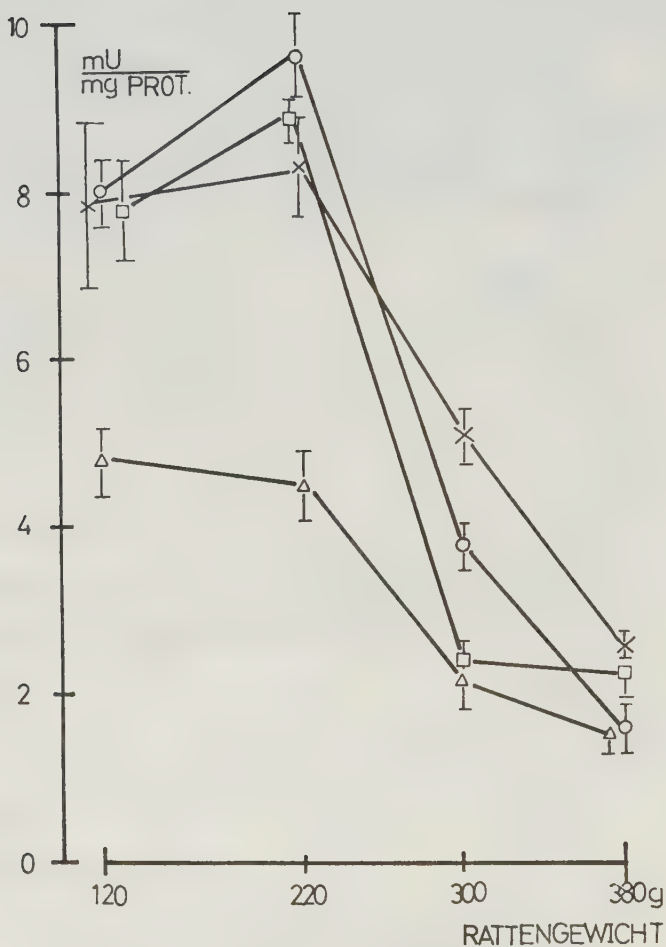


Abb.15 Darstellung der Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase im epididymalen Rattenfettgewebe postprandial bzw. nach 8, 24, 48, Stunden Hungerphasen in verschiedenen Altersklassen.

Mittelwert  $\pm$  s.e.m. n=10

- postprandiale Werte
- ×—× 8 Stunden Hunger
- 24 Stunden Hunger
- △—△ 48 Stunden Hunger

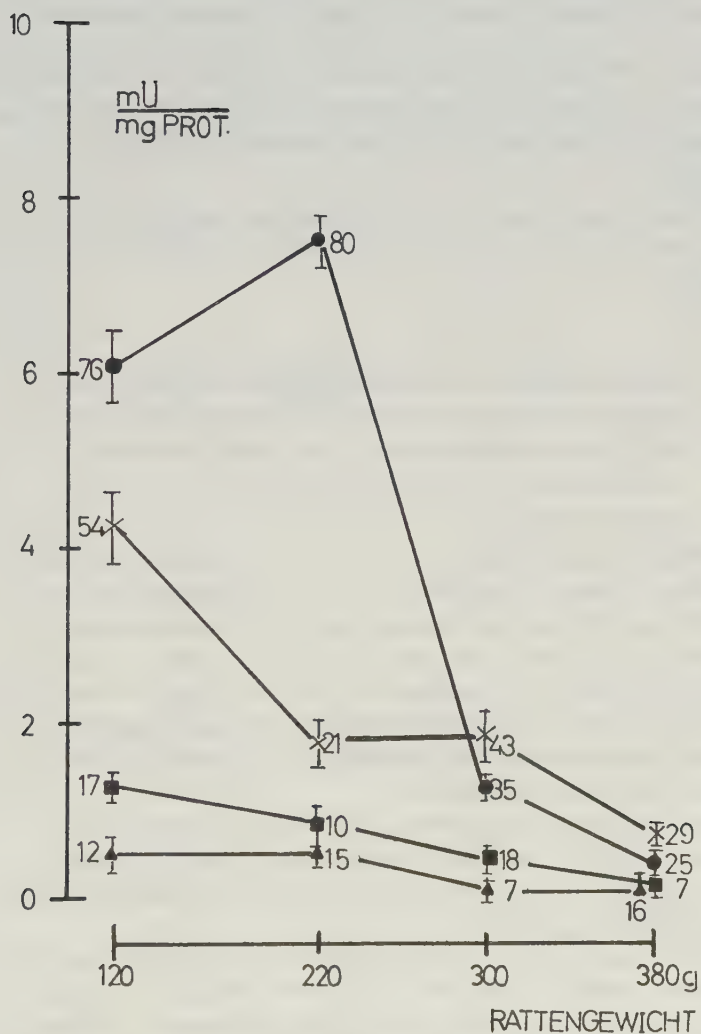


Abb.15a Darstellung des aktiven Anteils der Pyruvatdehydrogenase,  $\text{PDH}_2$ , im epididymalen Rattenfettgewebe postprandial bzw. nach 8, 24, 48 Stunden Hungerphasen. Symbole siehe Abb. 15.  
Mittelwert  $\pm$  s.e.m. n=10

schon postprandial niedrigen  $\text{PDH}_a$  Aktivitäten der Leber nahmen in jeder Altersgruppe nach 24 Stunden Hunger ab.

Wie Abb. 15 und 15a zeigen liegt im Fettgewebe der jüngsten Ratten 76 % nach 8 Stunden Hunger 54 % nach 24 Stunden Hunger 17 % und nach 48 Stunden Hunger nur noch 12 % als  $\text{PDH}_a$  vor.

Bei den alten Ratten (380 g) können postprandial nur 29 %  $\text{PDH}_a$  und nach 48 Stunden Hunger noch 16 %  $\text{PDH}_a$  gemessen werden.

### 3.3. Veränderungen des Interkonvertierungsgrades des Pyruvatdehydrogenasekomplexes nach Hunger bzw. nach Wiederauffütterung in der Leber - und im epididymalen Fettgewebe von Ratten verschiedener Altersklassen.

Wie Tab. 5 zeigt ändert sich bei jungen Ratten im Lebergewebe der Anteil der  $\text{PDH}_a$  von 21,3 % postprandial auf 7,4 % nach 48 Stunden Hunger. Nach 48 Stunden Wiederauffütterung erreichte der Anteil der  $\text{PDH}_a$  wieder 13,5 %. Das mitochondriale Bezugsenzym Glutamatdehydrogenase (GldH) blieb in seiner Aktivität auch nach dieser Hungerperiode nahezu unverändert. Der Quotient  $\text{PDH}_a/\text{GldH}$  war daher im Hunger deutlich vermindert.

Bei alten Ratten verminderte sich im Lebergewebe der Anteil der  $\text{PDH}_a$  nach 48 Stunden Hunger von 23 % postprandial auf 17 %. Trotz 24-stündiger Wiederauffütterung blieb die  $\text{PDH}_a$  bei 18 %.

Veränderungen der Enzymaktivitäten unter den gleichen Fütterungsbedingungen im epididymalen Fettgewebe zeigt Tab. 6. Bei jungen Ratten sank nach 48 Stunden Hunger die  $\text{PDH}_a$  von 80,5 % auf 8,4 %, nach 48 Stunden Wiederauffütterung erreichte sie mit 87,5 % wieder die postprandialen Werte. Die Glutamatdehydrogenaseaktivitäten verminderten sich nach 48 Stunden Hunger um ca. 30 %. Der Quotient  $\text{PDH}_a/\text{GldH}$  zeigte eine drastische Abnahme im Hunger und war nach der Wiederauffütterungsphase höher als der Ausgangswert.

Tab. 5 Aktivität der Pyruvatdehydrogenase im Lebergewebe von 200 g und 380 g schweren Ratten, die nach unterschiedlichen Hungerperioden mit Standardlaborfutter wieder- aufgefüttert wurden. Die Aktivitäten der Glutamatdehydrogenase (GLDH), Pyruvat- dehydrogenase (PDH) und ATP: Citratlyase sind in mU (nMol NAD<sup>+</sup> bzw. Acetyl-CoA gebildet pro Minute) pro mg Protein bei 25° C ± s.e.m. angegeben.

|                                  | PDH <sub>a</sub><br>mU/mg prot<br>± s.e.m.<br>n = 5 | PDH <sub>tot</sub><br>mU/mg Prot<br>± s.e.m.<br>n = 5 | % PDH <sub>a</sub><br>der<br>Gesamt-<br>aktivität | GLDH<br>mU/mg Prot<br>± s.e.m.<br>n = 5 | PDH <sub>a</sub><br>GLDH |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| Ratten 200 g<br>postprandial     | 0,97<br>± 0,10                                      | 4,56<br>± 0,41                                        | 21,3                                              | 1807<br>± 122                           | 5,4 x 10 <sup>-4</sup>   |
| 48 Std. Hunger                   | 0,33<br>± 0,08                                      | 4,47<br>± 0,48                                        | 7,4                                               | 1797<br>± 121                           | 1,8 x 10 <sup>-4</sup>   |
| 48 Std. Hunger<br>48 Std. Futter | 0,77<br>± 0,12                                      | 5,69<br>± 0,26                                        | 13,5                                              | 1706<br>± 98                            | 4,4 x 10 <sup>-4</sup>   |
| Ratten 380 g<br>postprandial     | 0,87<br>± 0,03                                      | 3,78<br>± 0,16                                        | 23,0                                              | 1415<br>± 87                            | 6,1 x 10 <sup>-4</sup>   |
| 48 Std. Hunger                   | 0,61<br>± 0,04                                      | 3,59<br>± 0,21                                        | 17,0                                              | 1480<br>± 64                            | 4,1 x 10 <sup>-4</sup>   |
| 48 Std. Hunger<br>24 Std. Futter | 0,95<br>± 0,08                                      | 5,26<br>± 0,20                                        | 18,0                                              | 1560<br>± 43                            | 6,0 x 10 <sup>-4</sup>   |

Tab. 6 Darstellung der Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten im epididymalen Fettgewebe von 200 g und 380 g schweren Ratten, die nach 48 Stunden Hunger mit Standardlaborfutter wiederaufgefüttert wurden. Die Aktivitäten der Glutamatdehydrogenase (GLDH), Pyruvatdehydrogenase (PDH) und der ATP: Citratlyase sind in mU (nMol NAD<sup>+</sup> bzw. Acetyl-CoA gebildet pro Minute) pro mg Protein bei 25° C ± s.e.m. angegeben.

|                                  | PDH <sup>a</sup><br>mU/mg Prot<br>± s.e.m.<br>n = 5 | PDH <sup>tot</sup><br>mU/mg Prot<br>± s.e.m.<br>n = 5 | % PDH<br>der<br>Gesamt-<br>aktivität | GLDH<br>mU/mg Prot<br>± s.e.m.<br>n = 5 | PDH <sup>a</sup><br>GLDH |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| Ratten 200 g<br>postprandial     | 7,52<br>± 0,32                                      | 9,34<br>± 0,53                                        | 80,5                                 | 122<br>± 4                              | 61 x 10 <sup>-3</sup>    |
| 48 Std. Hunger                   | 0,60<br>± 0,03                                      | 7,17<br>± 1,03                                        | 8,4                                  | 82<br>± 8                               | 7 x 10 <sup>-3</sup>     |
| 48 Std. Hunger<br>48 Std. Futter | 9,03<br>± 0,63                                      | 10,32<br>± 0,66                                       | 87,5                                 | 94<br>± 5                               | 96 x 10 <sup>-3</sup>    |
| Ratten 380 g<br>postprandial     | 0,41<br>± 0,04                                      | 1,64<br>± 0,15                                        | 25,0                                 | 108<br>± 7                              | 3,7 x 10 <sup>-3</sup>   |
| 48 Std. Hunger                   | 0,26<br>± 0,02                                      | 1,58<br>± 0,03                                        | 16,5                                 | 98<br>± 5                               | 2,6 x 10 <sup>-3</sup>   |
| 48 Std. Hunger<br>24 Std. Futter | 1,54<br>± 0,13                                      | 2,45<br>± 0,15                                        | 62,9                                 | 103<br>± 3                              | 14,9 x 10 <sup>-3</sup>  |

Bei alten Ratten verminderte sich im Fettgewebe nach 48 Stunden Hunger die  $PDH_a$  von 25 % auf 16,5 %. Dabei waren die Enzymaktivitäten der  $PDH_a$  insgesamt nur noch 5 % der postprandialen Ausgangsaktivitäten junger Ratten. Die Glutamatdehydrogenaseaktivitäten waren bei den alten Ratten kaum geringer als bei jungen Ratten. Der Quotient  $PDH_a/GldH$  im epididymalen Fettgewebe betrug nur noch 6 % im Vergleich zu den jungen Tieren.

#### 3.4. Aktivitätsbestimmungen des Pyruvatdehydrogenasekomplexes in unterschiedlichen Fettgeweben bei 200 g und 500 g schweren Ratten.

Wie Tab. 7 zeigt sollte im brauen-, epididymalen- und Nierenlagerfettgewebe untersucht werden, ob auch in anderen Fettgeweben ein Aktivitätsabfall der Pyruvatdehydrogenase mit dem Altern der Tiere festzustellen ist. Zum Vergleich wurden die Aktivitäten der Glutamatdehydrogenase und der ATP:Citratlyase mitbestimmt. Dabei fand sich im braunen Fettgewebe die höchste spezifische Aktivität der Pyruvatdehydrogenase Totalaktivität. Bei gleichbleibender Gesamtaktivität erhöhte sich der Anteil der  $PDH_a$  postprandial von ca. 12 % (200 g Tiere) auf ca. 50 % (500 g Tiere). Die Aktivität der Glutamatdehydrogenase blieb gleich. Die ATP:Citratlyase zeigte bei den ausgewachsenen Tieren eine Verdopplung der spezifischen Aktivität. Das braune Fettgewebe der ausgewachsenen Tiere hat sich also in seiner Enzymausstattung dem des epididymalen Fettgewebes der jungen Tiere angenähert. Im Gegensatz dazu war der Abfall der Aktivitäten für die Pyruvatdehydrogenase und die ATP:Citratlyase im Nierenlager- und vor allem im epididymalen Fettgewebe deutlich. Die spezifischen Aktivitäten der  $GldH$  änderten sich im Nierenlagerfettgewebe nicht und verminderten sich im epididymalen Fettgewebe nur gering.

Tab. 7 Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase, der Glutamatdehydrogenase und der ATP: Citratlyase in unterschiedlich lokalisierter Fettgewebearten bei ca. 200 g (I) und 500 g (II) schweren Ratten. Die Proben wurden postprandial entnommen. Aktivitätsangaben wie in Tab. 4

|                                 | PDH <sub>a</sub><br>mU/mg Prot<br>+ s.e.m.<br>n = 5 | PDH <sub>a</sub> tot<br>mU/mg Prot<br>+ s.e.m.<br>n = 5 | % PDH <sub>a</sub><br>der<br>Gesamt-<br>aktivität | GLDH<br>mU/mgProt<br>+ s.e.m.<br>n = 5 | ATP:Citr.Lyase<br>mU/mg Prot<br>+ s.e.m.<br>n = 5 |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|
| braunes<br>Fettgewebe           |                                                     |                                                         |                                                   |                                        |                                                   |
| I                               | 8,2<br>+ 2,5                                        | 66,5<br>+ 7,0                                           | 12,3                                              | 253<br>+ 10                            | 6,7<br>+ 0,8                                      |
| II                              | 29,0<br>+ 3,4                                       | 58,3<br>+ 2,5                                           | 49,7                                              | 230<br>+ 15                            | 13,7<br>+ 1,6                                     |
| Nieren-<br>lagerfett-<br>gewebe |                                                     |                                                         |                                                   |                                        |                                                   |
| I                               | 3,5<br>+ 1,8                                        | 6,6<br>+ 0,7                                            | 53,0                                              | 103<br>+ 9                             | 12,1<br>+ 2,1                                     |
| II                              | 1,8<br>+ 0,5                                        | 3,1<br>+ 0,4                                            | 58,1                                              | 101<br>+ 6                             | 0,4<br>+ 0,0                                      |
| epididym.<br>Fettgewebe         |                                                     |                                                         |                                                   |                                        |                                                   |
| I                               | 15,9<br>+ 1,2                                       | 15,4<br>+ 1,4                                           | 103,2                                             | 102<br>+ 4                             | 15,7<br>+ 1,5                                     |
| II                              | 0,67<br>+ 0,05                                      | 2,0<br>+ 0,1                                            | 33,5                                              | 81<br>+ 4                              | 0,4<br>+ 0,0                                      |

### 3.5. Messungen der Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten in menschlichen Geweben.

3.5.1. In Untersuchungen, bei denen die Fettsäuresynthese in Biopsieproben menschlichen Fettgewebes von Erwachsenen bestimmt wurde, konnte keine nennenswerte Fettsäureneusynthese nachgewiesen werden (13, 47, 48). Das Fettgewebe von Kindern ist hinsichtlich der Fettneusynthese nur wenig untersucht. Es war deshalb von Interesse, ob der Pyruvatdehydrogenasekomplex im menschlichen Gewebe, ähnlich wie bei den Ratten, vom Alter abhängige unterschiedliche Enzymaktivitäten zeigt. Es wurde das subcutane Fettgewebe von Kindern (bis 11 Jahre) und von Erwachsenen (ab 25 Jahren) untersucht, das intra operationem gewonnen und sofort tiefgefroren wurde.

Wie Tab. 8 zeigt unterscheiden sich die Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten im subcutanen Fettgewebe von Kindern und Erwachsenen nicht. Die Gesamtaktivitäten liegen etwa vergleichbar zur Aktivität dieses Enzyms im epididymalen Fettgewebe von Ratten mit mehr als 380 g Körpergewicht. Da die Proben intra operationem gewonnen wurden, war eine mehr oder weniger lange Hungerperiode vorausgegangen. Nur bei den Säuglingen bis zu 12 Monaten (keine längere Hungerperiode) ließ sich eine geringe  $PDH_a$ -Aktivität nachweisen. (Bei 3 Säuglingen im Alter zwischen 3 und 12 Monaten fand sich eine Aktivität an  $PDH_a$  von 0,31 - 0,43 mU/mg Prot. bei einer Gesamtaktivität von 1,52 - 2,06 mU/mg Prot.) Die Gesamtaktivitäten lagen bei Kindern und Erwachsenen um 2 mU/mg Protein. Die Aktivitäten der ATP:Citratlyase waren bei beiden Gruppen sehr gering.

3.5.2. Nach geltender Vorstellung ist die Fettsäureneusynthese aus Kohlenhydraten beim Menschen hauptsächlich im Lebergewebe lokalisiert. Es wurde deshalb im menschlichen Lebergewebe die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität bestimmt. Das Gewebe wurde bei Routinepunktionen gewonnen.

Tab. 8 Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase, der Glutamatdehydrogenase und der ATP: Citratlyase im menschlichen subcutanen Fettgewebe von Kindern bis 11 Jahren und von Erwachsenen. Die Gewebeproben wurden intra operationem gewonnen und sofort tiefgefroren. Die Aktivitäten sind in mU pro mg Protein bei 25° C + s.e.m. angegeben.

|                                    | PDH <sub>a</sub><br>mU/mg Prot<br>+ s.e.m. | PDH <sub>tot</sub><br>mU/mg Prot<br>+ s.e.m. | % PDH <sub>a</sub><br>der<br>Gesamt-<br>aktivität | GLDH<br>mU/mg Prot<br>+ s.e.m. | ATP:Citrat-<br>lyase<br>mU/mg Prot |
|------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Kinder bis<br>11 Jahre<br>n = 15   | 0 - 0,42                                   | 2,02<br>+ 0,15                               | 0 - 21                                            | 54,8<br>+ 3,7                  | 0 - 0,2                            |
| Erwachsene ab<br>25 Jahre<br>n = 6 | 0,38<br>+ 0,04                             | 1,95<br>+ 0,25                               | 19                                                | 69,1<br>+ 6,3                  | 0 - 0,45                           |

Die Untersuchungen wurden bei insulinpflichtigen Diabetikern nach 16 Stunden Hunger und nach Insulingabe und Diabetiker-Frühstück durchgeführt. Als Kontrollen dienten Nichtdiabetiker nach 16 Stunden Hunger und 90 Minuten nach einer oralen Glucosebelastung mit 100 g Glucose.

Wie Tab. 9 zeigt fanden sich keine großen Unterschiede der spezifischen Aktivität der Pyruvatdehydrogenase bei Diabetikern und Nichtdiabetikern. Dabei waren die Pyruvatdehydrogenase-Aktivitäten insgesamt gering. Der Pyruvatdehydrogenase<sub>a</sub>-Anteil lag in beiden Gruppen relativ hoch. Bei den Diabetikern lag der Prozentsatz der Pyruvatdehydrogenase<sub>a</sub> sowohl im Hunger als auch nach Insulin und Frühstück niedriger als bei den Nichtdiabetikern. Der Quotient von  $\text{PDH}_a$  zu Glutamatdehydrogenase war bei den Diabetikern nach Insulin und Frühstück doppelt so hoch als nach 16 Stunden Hunger. Bei den Nichtdiabetikern war dieser Effekt weniger ausgeprägt.

Tab. 9 Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase im menschlichen Lebergewebe bei Normalpersonen und bei insulinpflichtigen Diabetikern. Die Proben wurden bei Routineleberpunktionen gewonnen und sofort tiefgefroren. Die Aktivitäten sind in mU (nMol NAD<sup>+</sup> bzw. Acetyl-CoA gebildet pro Minute) pro mg Protein bei 25° C  $\pm$  s.e.m. angegeben.

|                                                                           | PDH <sub>a</sub><br>mU/mg Prot<br>$\pm$ s.e.m.<br>n = 5 | PDH <sub>tot</sub><br>mU/mg Prot<br>$\pm$ s.e.m.<br>n = 5 | % PDH <sub>a</sub><br>der<br>Gesamt-<br>aktivität | GLDH<br>mU/mg Prot<br>$\pm$ s.e.m.<br>n = 5 | $\frac{\text{PDH}_a}{\text{GLDH}}$<br>n = 5 |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Diabetiker<br>16 Std. Hunger                                              | 0,65<br>$\pm$ 0,06                                      | 1,92<br>$\pm$ 0,12                                        | 34                                                | 1485<br>$\pm$ 45                            | $4,3 \times 10^{-4}$                        |
| Diabetiker<br>Insulin<br>+ Frühstück                                      | 0,90<br>$\pm$ 0,12                                      | 2,54<br>$\pm$ 0,27                                        | 35                                                | 1114<br>$\pm$ 213                           | $8,0 \times 10^{-4}$                        |
| Normalpersonen<br>16 Std. Hunger                                          | 0,84<br>$\pm$ 0,06                                      | 1,49<br>$\pm$ 0,11                                        | 56                                                | 1335<br>$\pm$ 179                           | $6,2 \times 10^{-4}$                        |
| Normalpersonen<br>90 Minuten nach<br>oraler Glucose-<br>belastung (100 g) | 1,29<br>$\pm$ 0,23                                      | 2,91<br>$\pm$ 0,31                                        | 44                                                | 1652<br>$\pm$ 123                           | $7,8 \times 10^{-4}$                        |

#### 4.0. Diskussion

Die Regulation der Fettsäureneusynthese liegt auf der cytosolischen und der mitochondrialen Ebene. Im Fettgewebe ist die Fettsäureneusyntheserate einerseits vom Glucoseangebot und der Insulinkonzentration an der Fettzelle abhängig -wobei die Glucoseaufnahme von Insulin stimuliert wird (21, 22, 23, 24)- andererseits spielen die Aktivitäten verschiedener Enzyme im Syntheseweg eine wichtige Rolle.

Die Acetyl-CoA Carboxylase, der erste Schritt in der Reaktionskette der cytosolischen Fettsäuresynthese wird durch langkettige Acyl-CoA Derivate gehemmt (4, 14). Die Hemmung ist kompetitiv mit Citrat, das selbst als ein Aktivator der Acetyl-CoA Carboxylase wirkt (30, 34). Acyl-CoA wirkt auch als Hemmstoff des Fettsäuresynthetase-Komplexes (6). Ebenso besteht eine allosterische Hemmung durch Malonyl-CoA, sie ist wiederum kompetitiv zu  $\text{NADH}_2$  und Fructose 1,6 Bi - phosphat (36). Außerdem wird eine mögliche Schrittmacherefunktion in der Entstehungsgeschwindigkeit von cytosolischem Acetyl-CoA an der ATP:Citratlyase diskutiert (7, 15, 46), die aber bei der Ratte nicht geschwindigkeitsbestimmend ist (Tab. 3). Eine weitere Regulationsmöglichkeit liegt mitochondrial auf der Ebene der Aktivität des Pyruvatdehydrogenasekomplexes.

Auf die Bedeutung der Pyruvatdehydrogenase als Schrittmacherezym der Fettsäuresynthese im epididymalen Fettgewebe junger Ratten deuten vorausgehende Untersuchungen hin (53, 54). Es zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der Fettsäuresynthesegeschwindigkeit vom Aktivitätszustand des Pyruvatdehydrogenasesystems. Die dabei gemessene Enzymaktivitäten von  $\text{PDH}_a$  stimmen mit den aus der Literatur bisher bekannten Daten über den Einbau von Glucosekohlenstoff in Triglyceridfettsäuren in Anwesenheit und Abwesenheit von Insulin gut überein (5, 7, 17, 28, 61, 65). Die Vermittlung des Insulineffektes auf den Pyruvatdehydrogenasekomplex geschieht nach den bis-

her vorliegenden experimentellen Untersuchungen (53, 54) möglicherweise durch geänderte Metabolitenkonzentrationen und damit Effektorkonzentrationen in der Zelle als Folge des Hormonstimulus. Es wird diskutiert, daß die Fettsäuresynthesesteigerung durch Insulin die Folge eines erniedrigten intramitochondrialen ATP/ADP-Quotienten infolge eines gesteigerten Glucosetransportes, eines erhöhten ATP-Turnovers und einer Enthemmung der Adeninnukleotidtranslokase ist (53, 54).

Die Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit von Pyruvat wird also nicht durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration des Pyruvatdehydrogenasekomplexes (41), sondern durch eine Vergrößerung des aktiven Enzymanteils erreicht. Eine Beteiligung des Adenylat-Cyclase-Systems an der Vermittlung der Insulinwirkung auf die Pyruvatdehydrogenase unter Normalbedingungen ist nicht sehr wahrscheinlich. Cyclo-AMP zeigt, soweit bis jetzt bekannt ist, keinen Einfluß auf das Interkonvertierungsgleichgewicht des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes. So ist der Effekt von Insulin auf die Pyruvatdehydrogenase trotz Stimulierung der Triglyceridhydrolyse durch Noradrenalin -was einer Aktivierung der Adenylatcyclase entspricht- in physiologischen Hormondosen voll erhalten (53).

In den vorliegenden Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob sich die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase gleichsinnig wie die Kapazität zur Fettsäureneusynthese mit dem Altern der Tiere und bei verschiedenen Ernährungsbedingungen verändert.

Von mehreren Untersuchern wurde im epididymalen Rattenfettgewebe eine deutliche Verminderung der Fettsäureneusynthese bei ausgewachsenen Ratten (400 g) festgestellt (11, 12, 13, 39, 47). Während bei jungen Ratten (200 g) 20 % bis 40 % der aufgenommenen Glucose in Glycerid-Glycerin und 20 % bis 40 % in Fettsäuren umgewandelt werden, werden bei alten Ratten 2 % bis 3 % der aufgenommenen Glucose in Fettsäuren und 60 % bis 70 % in Glycerid-Glycerin eingebaut (12, 39). Der Insulineffekt auf die Fettsäureneusynthese

ist bei erwachsenen Tieren deutlich vermindert (12, 13). Die Ursachen für die Veränderungen des Fettsäurestoffwechsels werden von den einzelnen Untersuchern unterschiedlich erklärt. Doch dürfte eine veränderte Enzymausstattung und damit Funktionswandlung der Fettzelle eine wesentliche Rolle spielen. Abb. 10, 11 zeigen im epididymalen Fettgewebe eine deutliche Verminderung der Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten mit dem Altern der Tiere. Anhand der Glutamatdehydrogenaseaktivitäten (einem ausschließlich mitochondrial lokalisierten Enzym) ist eine Verminderung der Mitochondrienzahl im Fettgewebe alter Ratten nicht anzunehmen (Tab. 3). Man muß also vermuten, daß die Pyruvatdehydrogenase selektiv vermindert ist. Diese Daten decken sich gut mit den bisherigen Erkenntnissen, da bei stark verminderter Pyruvatdehydrogenaseaktivität kaum eine de novo Fettsäuresynthese aus Glucose im Fettgewebe stattfinden kann (47). Von anderen Autoren wird der Bereitstellung von cytosolischem Acetyl-CoA eine Schrittmachfunktion für die Fettsäuresynthesegeschwindigkeit zugesprochen (7, 15, 46). Dafür ist die Umwandlung von mitochondrialem Acetyl-CoA zu Citrat, dessen Translokation in das Cytosol und die Rückspaltung in Oxalacetat und Acetyl-CoA durch die cytosolische ATP:Citratlyase die Voraussetzung. Wie Tab. 3 zeigt vermindern sich bei alten Ratten auch die Aktivitäten der ATP:Citratlyase auf weniger als 10 % der Aktivitäten von jungen Tieren. Die Ursache für den starken Aktivitätsverlust beider Enzyme ist bisher nicht geklärt.

Das menschliche Fettgewebe, das bisher nur wenig untersucht ist, zeigt insgesamt im Vergleich zum Fettgewebe der jungen Ratte oder anderer Spezies nur eine geringe Aktivität der für die Fettsäuresynthese maßgeblichen Enzyme (13, 47, 48, 49). Diese Beobachtungen konnten durch die eigenen Untersuchungen am subcutanen menschlichen Fettgewebe bestätigt werden (Tab.8).

Die Aktivitäten der ATP:Citratlyase waren äußerst gering, zum Teil unterhalb der Empfindlichkeit des verwandten Testes. Bei Experimenten, in denen der Einbau von radioaktiv markiertem Pyruvat in Triglyceride im Fettgewebe junger- und alter Ratten und des Menschen bestimmt wurde (47,9) fand sich etwa dieselbe Relation des Einbaus von markiertem Pyruvat, wie sie sich auch bei den Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten zeigte. Alte Ratten zeigten nur ca. 10 % der PDH-Aktivitäten junger Ratten (Abb. 10) und bauten auch nur 15 % markiertes Pyruvat in Triglyceride ein (47). Im menschlichem Fettgewebe war der Einbau von markiertem Pyruvat noch geringer (47); die PDH-Aktivitäten des Menschen zeigten ähnliche Werte wie bei alten Ratten (Abb. 8). Die PDH-Aktivitäten unterschieden sich in unseren Untersuchungen bei Kindern und Erwachsenen nicht. Dies steht in gewissem Gegensatz zu GRIES und STEINKE (13), die in kindlichem subcutanen Fettgewebe höhere -wenngleich noch immer sehr geringe- Einbauraten von C<sup>14</sup>-markierter Glucose in Fettsäuren im Vergleich zum Erwachsenen fanden. Ihre Experimente deuten darauf hin, daß beim Menschen, entsprechend den Verhältnissen bei der Ratte, das Fettgewebe des Erwachsenen die Fähigkeit zur Synthese von Fettsäuren aus Kohlenhydraten verliert. Um eine klare Aussage über die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase als Schrittmacherenzym der Fettsäuresynthese beim Menschen machen zu können, müssen die Ergebnisse der Pyruvatdehydrogenasemessungen in menschlichen Geweben durch weitere Experimente vervollständigt werden.

Die hungerabhängige Inaktivierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und die Reaktivierung in der Wiederauffütterungsphase zeigte sich in allen Altersgruppen der Ratten. Bis 24-stündigem Hunger verminderte sich der aktive Anteil der Pyruvatdehydrogenase nahezu linear (siehe Abb. 15, 15a) bei unveränderter Gesamtaktivität. Nach längeren Hungerphasen verminderte sich auch die Gesamtaktivität, was mit einem verminderten Enzymbestand erklärt werden kann. Eine nahezu

vollständige Reaktivierung war nach Wiederauffütterung (Tab. 6) der Tiere zu erreichen, wobei sich jedoch das Aktivitätsniveau zwischen alten und jungen Ratten deutlich unterschied.

Die bisher genannten regulativen Einflüsse auf den PDH-Komplex wurden hauptsächlich an Fettzellen und Fettgewebefragmenten studiert. Durch Perfusionsuntersuchungen an Rattenlebern (35) konnte ebenfalls gezeigt werden, daß durch Vermehrung des Substratangebotes, wie Glucose, Fructose oder Pyruvat im Perfusionsmedium der aktive Teil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes vermehrt ist. Allerdings konnte an der Leber im Gegensatz zu Fettzellen in vitro kein Insulineffekt nachgewiesen werden (63). Durch Zugabe von Oleat zum Perfusionsmedium, wodurch die Bedingungen einer gesteigerten Lipolyse imitiert wurden, verminderte sich der aktivierende Effekt von Glucose deutlich (35). Auch in der Leber scheint der Pyruvatdehydrogenase-Komplex durch das Substratangebot einerseits und durch Lipolyseprodukte andererseits über cytosolische Metabolitenänderungen reguliert zu werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente an Ratten verschiedenen Alters zeigen, daß sich der Pyruvatdehydrogenase-Komplex in der Rattenleber sowohl in der Gesamtaktivität als auch im aktiven Anteil bei bis zu 500 g schweren Tieren nicht wesentlich ändert (Abb. 12). Dabei sind die Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase im Vergleich zum Rattenfettgewebe relativ gering. Das Lebergewebe scheint, da unter Standardbedingungen nur 20 % des Gesamtkomplexes in der aktiven Form vorliegen, aus Pyruvat mehr Glucose neu zu synthetisieren als in Fettsäuren umzuwandeln, zumal die Aktivität der Pyruvatcarboxylase, das erste Enzym der Gluconeogenese aus Pyruvat in der Leber 10 bis 20 mal aktiver ist, als der Pyruvatdehydrogenase-Komplex (3).

Der Aktivitätsabfall im Hunger war nachzuweisen (Abb. 14), aber im Vergleich zur PDH<sub>a</sub> im Fettgewebe verminderten sich die Aktivitäten im Lebergewebe nur wenig. Bemerkenswert ist

in der Wiederauffütterungsphase die Versechsfachung der Aktivität der ATP:Citratlyase (57) bei jungen Ratten, während die  $PDH_a$  wieder postprandiale Werte erreicht. Bei den Aktivitätsmessungen der Pyruvatdehydrogenase im menschlichen Lebergewebe (Abb. 7) war der deutlich höhere Anteil der  $PDH_a$  bei den Normalpersonen (Nichtdiabetiker) auffallend, die Aktivitäten waren allerdings insgesamt im Vergleich zur Ratte nur sehr gering.

## Zusammenfassung

Die Bedeutung der Pyruvatdehydrogenase als eines der Schrittmacherenzyme der Lipogenese wurde in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt.

In dieser Arbeit wurden die Enzymaktivitäten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes am Untersuchungsmodell der Ratte in Abhängigkeit von Alter und Ernährungsbedingungen bestimmt.

Dabei zeigte sich im epididymalen Fettgewebe der Ratten eine starke Aktivitätsverminderung mit dem Altern der Tiere, die nicht auf eine verminderte Mitochondrienzahl oder Enzym-inhibitoren zurückgeführt werden kann. Auffallend war die ebenfalls starke Abnahme der ATP:Citratlyaseaktivitäten. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen erklären den Verlust in der Fähigkeit zum Einbau von Glucosekohlenstoff in Triglyceridfettsäuren bei den älteren Tieren.

Unter verschiedenen Hungerbedingungen kam es zu einem reversiblen Abfall der Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes. Im Rattenlebergewebe blieben die Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten über alle Altersstufen nahezu konstant. Die Reaktion auf Hunger oder Wiederauffütterung waren in der Leber im Vergleich zum epididymalen Fettgewebe nur gering. In Anwendung der bei Ratten gewonnenen Ergebnisse wurden Pyruvatdehydrogenaseaktivitäten im menschlichen Gewebe bestimmt. Im subcutanen Fettgewebe von Kindern fanden sich im Gegensatz zur Ratte keine höheren PDH-Aktivitäten als bei Erwachsenen. Die Aktivitäten waren in allen Fällen nur gering. Die Aktivitäten der ATP:Citratlyase waren ebenfalls sehr niedrig und nur bei erwachsenen Personen immer messbar. Die Pyruvatdehydrogenase-Gesamtaktivitäten waren im Lebergewebe von Diabetikern und Normalpersonen gleich, während der aktive Anteil der Pyruvatdehydrogenase bei Normalpersonen gering höher lag.

## 6. Literatur

1. Abou-Issa, H.M. & Cleland, W.W.  
Studies on the microsomal acylation of L-glycerol-3-phosphate.  
II. The specificity and properties of the rat liver enzyme.  
Biochim. Biophys. Acta 176 (1969) 692
2. Boehringer Mannheim GmbH, Testkombination GLDH aktiviert,  
nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für  
Klinische Chemie.  
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 12 (1974) 391
3. Böttger, J., Wieland, O.H., Brdiczka, D. & Pette, D.  
Eur. J. Biochem. 8 (1969) 113
4. Bortz, W.M. & Lynen, F.  
The inhibition of acetyl CoA carboxylase by long chain  
acyl CoA derivatives.  
Biochem. Z. 337 (1963) 505
5. Denton, R.M., Coore, H.G., Martin, B.R. & Randle, P.J.  
Insulin activates pyruvate dehydrogenase in rat  
epididymal adipose tissue.  
Nature New Biol. 231 (1971) 115
6. Dorsey, J.A. & Porter, J.W.  
The effect of palmityl coenzyme A on pigeon liver  
fatty acid synthetase.  
J. Biol. Chem. 243 (1968) 3512
7. Flatt, J.P. & Ball, E.G.  
Studies on the metabolism of adipose tissue.  
XV. An evaluation of the major pathways of glucose  
catabolism as influenced by insulin and epinephrine.  
J. Biol. Chem. 239 (1964) 675
8. Frerichs, H. & Ball, E.G.  
Studies on the metabolism of adipose tissue.  
XI. Activation of phosphorylase by agents which  
stimulate lipolysis.  
Biochemistry 1 (1962) 501
9. Galton, D.J.  
Lipogenesis in human adipose tissue.  
J. Lipid Res. 9 (1968) 19
10. Garland, P.B. & Randle, P.J.  
Control of pyruvate dehydrogenase in the perfused rat  
heart by the intracellular concentration of acetyl-  
coenzyme A.  
Biochem. J. 91 (1964) 6 c
11. DiGirolamo, M., Howe, M.D., Esposito, J., Thurman, L. &  
Owens, L.  
Metabolic patterns and insulin responsiveness of  
enlarging fat cells.  
J. Lipid Research 15 (1974) 332

12. DiGirolamo, M. & Mendlinger, S.  
Glucose metabolism and responsiveness to bovine insulin  
by adipose tissue from three mammalian species.  
Diabetes 21 (1972) 1151
13. Gries, F.A. & Steinke, J.  
Comparative effects of insulin on adipose tissue  
segments and isolated fat cells of rat and man.  
J. Clin. Invest. 46 (1967) 1413
14. Halestrap, A.P. & Denton, R.M.  
Insulin and the regulation of adipose tissue acetyl-  
coenzyme A carboxylase.  
Biochem. J. 132 (1973) 509
15. Halperin, M.L.  
An additional role for insulin in the control of fatty  
acid synthesis independent of glucose transport.  
Can. J. Biochem. 48 (1970) 1228
16. Hucho, F., Randall, D.D., Roche, T.E., Burgett, M.W.,  
Pelley, J.W. & Reed, L.J.  
 $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes.  
XVII. Kinetic and regulatory properties of pyruvate  
dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphatase  
from bovine kidney and heart.  
Arch. Biochem. Biophys. 151 (1972) 328
17. Katz, J. & Rognstad, R.  
The metabolism of tritiated glucose by rat adipose tissue.  
J. Biol. Chem. 241 (1966) 3600
18. Kolb, H.  
Identification of the catalytically active form of  
pyruvate dehydrogenase from pig heart muscle.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355 (1974) 401
19. Kornacker, M.S. & Ball, E.G.  
Citrate cleavage in adipose tissue.  
Proc Nat. Acad. Sci. (Wash.) 54 (1965) 899.
20. Kornberg, A. & Pricer, W.E.  
Enzymatic esterification of  $\alpha$ -glycerophosphate by long  
chain fatty acids.  
J. Biol. Chem. 204 (1953) 345
21. Krah1, M.E.  
The effect of insulin and pituitary hormones on  
glucose uptake in muscle.  
Amn. N. Y. Acad. Sci. 54 (1951) 649
22. Levine, R., Goldstein, M., Huddleston, B. & Klein, S.  
Action of insulin on the permeability of cells to free  
hexoses as studies by its effects on the distribution  
of galactose.  
Am. J. Physiol. 163 (1950) 70

23. Levine, R., Goldstein, M., Klein, S. & Huddlestun, B.  
The action of insulin on the distribution of galactose  
in eviscerated nephrectomized dogs.  
J. Biol. Chem. 179 (1949) 985
24. Levine, R., Goldstein, M.  
On the mechanism of action of insulin.  
Res. Progr. Hormone Res. 11 (1955) 343
25. Linn, T.C., Pettit, F.H., Hucho, F. & Reed, L.J.  
 $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes.  
XI. Comparative studies of regulatory properties  
of the pyruvate dehydrogenase complexes from kidney,  
heart, and liver mitochondria.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64 (1969) 227
26. Linn, T.C., Pettit, F.H. & Reed, L.J.  
 $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes;  
X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydro-  
genase complex from beef kidney mitochondria by phospho-  
rylation and dephosphorylation.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 62 (1969) 234
27. Löffler, G. & Weiss, L.  
Lipase activities in adipose tissue.  
In: Jeanrenaud, B., Hepp, K.D., (Hrsgb),  
Adipose Tissue Regulation and Metabolic Functions,  
S. 32, Stuttgart, Thieme 1970
28. Löffler, G.  
Habilitationsschrift  
Med. Hochschule Hannover 1967
29. Lowenstein, J.M.  
Persönliche Mitteilung
30. Martin, D.B. & Vagelos, P.R.  
The mechanism of tricarboxylic acid cycle regulation  
of fatty acid synthesis.  
J. Biol. Chem. 237 (1962) 1787
31. Matlib, M.A. & O'Brien, P.J.  
Compartmentation of enzymes in the rat liver mitochondrial  
matrix.  
Arch. Biochem. Biophys. 167 (1975) 193
32. Mowbray, J.  
A mitochondrial monocarboxylate transporter in rat liver  
and heart and its possible function in cell control.  
Biochem. J. 148 (1975) 41
33. Nestorescu, M.L., Siess, E.A. & Wieland, O.H.  
Ultrastructural localization of pyruvate dehydrogenase  
in rat heart muscle.  
Histochemie 34 (1973) 355

34. Numa, S., Matsuhashi, M. & Lynen, F.  
Zur Störung der Fettsäuresynthese bei Hunger und Alloxan Diabetes.  
I. Fettsäuresynthese in der Leber normaler und hungernder Ratten.  
Biochem. Z. 334 (1961) 203
35. Patzelt, C., Löffler, G. & Wieland, O.H.  
Interconversion of pyruvate dehydrogenase in the isolated perfused rat liver.  
Eur. J. Biochem. 33 (1973) 117
36. Plate, C.A., Joshi, V.C., Sedgwick, B. & Wakil, S.J.  
Studies on the mechanism of fatty acid synthesis.  
XXI. The role of fructose 1,6-diphosphate in the stimulation of the fatty acid synthetase from pigeon liver.  
J. Biol. Chem. 243 (1968) 5439
37. Reed, L.J., Linn, T.C., Hucho, F., Namiyama, G., Barrera, C.R., Roche, T.E., Pelley, J.W. & Randall, D.D.  
Molecular aspects of the regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex.  
In: Metabolic Interconversions of Enzymes (Wieland, O.H., Helmreich, E. & Holzer, H., eds.) p. 281, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
38. Renold, A.E. & Jeanrenaud, B.  
Insulin und Transportvorgänge.  
In: Wieland, O.H. Mehnert, H. (Hrsgb.) Biochemie und Klinik des Insulinmangels, S. 28.  
Stuttgart, Thieme 1971
39. Rudman, D. & Girolamo, M.D.  
Comparative studies on the physiology of adipose tissue.  
Advances in Lipid Research 5 (1967) 35
40. Saggerson, E.D. & Greenbaum, A.L.  
The regulation of triglyceride synthesis and fatty acid synthesis in rat epididymal adipose tissue. Effects of insulin, adrenaline and some metabolites in vitro.  
Biochem. J. 119 (1970) 193
41. Sica, V. & Cuatrecasas, P.  
Effects of insulin, epinephrine, and cyclic adenosine monophosphate on pyruvate dehydrogenase of adipose tissue.  
Biochemistry, 12 (1973) 2282
42. Siess, E., Wittmann, J. & Wieland, O.H.  
Interconversion and kinetic properties of pyruvate dehydrogenase from brain.  
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 352 (1971) 447
43. Siess, E., Forschergruppe Diabetes München  
Unveröffentlichte Daten.

44. Srere, P.A.  
Citrate-cleavage enzyme.  
Methods in Enzymology 5 (1962) 641
45. Siess, E.A. & Wieland, O.H.  
Purification and characterization of pyruvate  
dehydrogenase phosphatase from pig heart muscle.  
Eur. J. Biochem. 26 (1972) 96
46. Schmidt, K. & Katz, J.  
Metabolism of pyruvate and l-lactate by rat adipose  
tissue.  
J. Biol. Chem. 244 (1969) 2125
47. Shrago, E., Glennon, J.A. & Gordon, E.S.  
Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues.  
Metabolism, 20 (1971) 54
48. Shrago, E., Spennetta, T. & Gordon, E.  
Fatty acid synthesis in human adipose tissue.  
J. Biol. Chem. 244 (1969) 2761
49. Shrago, E. Glennon, J.A. & Gordon, E.S.  
Studies on enzyme concentration and adaptation in  
human liver and adipose tissue.  
J. Clin. Endocr. 27 (1967) 679
50. Srere, P.A. & Bhaduri, A.  
Incorporation of radioaktive citrate into fatty acids.  
Biochem. Biophys. Acta 59 (1962) 487
51. Tabor, H., Mehler, A.H. & Stadtman, E.R.  
The enzymatic acetylation of amines.  
J. Biol. Chem. 204 (1953) 127
52. Weiss, L. & Löffler, G.  
Interrelationship between adipose tissue and liver:  
Gluconeogenesis and ketogenesis.  
In: Jeanrenaud, B., Hepp, K.D. (Hrsgb.),  
Adipose Tissue Regulation and Metabolic Functions,  
S. 196, Stuttgart, Thieme 1970
53. Weiss, L.  
Regulation der Lipidsynthese im Fettgewebe durch Insulin  
auf der Stufe der Pyruvatdehydrogenase.  
Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilian-Universität  
München (1975)
54. Weiss, L., Löffler, G. & Wieland, O.H.  
Regulation by insulin of adipose tissue pyruvate  
dehydrogenase.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355 (1974) 363

55. Weiss, L., Kreisel, C., Haslbeck, M. & Wieland, O.H.  
Activity in adipose tissue and liver of pyruvate  
dehydrogenase (PDH) and ATP: Citrate lyase (ATP:CL).  
(Abstract) Diabetologia 11 (1975) 383
56. Weiss, L., Kreisel, C., Löffler, G. & Wieland, O.H.  
Einfluß von Alter und Ernährung auf den Interkonver-  
tierungsgrad der Pyruvatdehydrogenase in Leber und  
Fettgewebe der Ratte.  
Ernährungs-Umschau 21 (1974) 339
57. Weiss, L.  
Unveröffentlichte Daten.
58. Wieland, O.H. & Suyter, M.  
Glycerokinase. Its isolation and properties.  
Biochem. Z. 329 (1957) 320
59. Wieland, O.H. & Siess, E.A.  
Interconversion of phospho- and dephosphoforms of  
pig heart pyruvate dehydrogenase.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 65 (1970) 947
60. Wieland, O.H.  
On the mechanism of irreversible pyruvate dehydrogenase  
inactivation in liver mitochondrial extracts.  
FEBS-Letters 52 (1975) 44
61. Wieland, O.H., Siess, E.A., Weiss, L., Löffler, G.,  
Patzelt, C., Portenhauser, R., Hartmann, U. & Schirmann, A.  
Regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase  
complex by covalent modification.  
Symp. Soc. Exp. Biol. 27 (1973) 371
62. Wieland, O.H., Siess, E.A., Funcke, H.J.v.,  
Patzelt, C., Schirmann, A., Löffler, G. & Weiss, L.  
Regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase  
complex: Physiological aspects and characterization  
of PDH-phosphatase from pig heart.  
In: 2nd Int. Symp. on Metabolic Interconversion of  
Enzymes (Wieland, O.H., Helmreich, E. & Holzer, H.,  
eds.) p. 293
63. Wieland, O.H., Patzelt, C. & Löffler, G.  
Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase  
in rat liver.  
Effect of starvation and refeeding and of insulin  
treatment on pyruvate dehydrogenase interconversion.  
Eur. J. Biochem. 26 (1972) 426

64. Winegrad, A.J. & Renold, A.E.  
Studies on rat adipose tissue in vitro.  
I. Effects of insulin on the metabolism of glucose  
pyruvate and acetate.  
J. Biol. Chem. 233 (1958) 267
65. Zaragoza-Hermans, N. & Felber, J.P.  
Studies on the metabolic effects induced in the rat  
by a high fat diet.  
(U -  $^{14}$  C) Glucose metabolism in epididymal adipose  
tissue.  
Eur. J. Biochem. 25 (1972) 89

Zu besonderem Dank bin ich verpflichtet dem Direktor des Klinisch-chemischen Institutes und Leiter der Forschergruppe Diabetes im Städtischen Krankenhaus Schwabing, München, Prof. Dr. O.H. Wieland und dessen Oberarzt Priv.Do. Dr. L. Weiss, der mir die Anregung zu dieser Arbeit gab und deren Entstehung großzügig und mit wertvollem Rat unterstützte.

Ebenfalls besonders danken möchte ich Prof. Dr. G. Löffler, Priv. Doz. Dr. E. Siess, Priv. Doz. Dr. H. Kolb und Frl. Hungbauer, Mitglieder der Forschergruppe Diabetes, für technische Hilfe und wertvolle Ratschläge.

Besonderen Dank schulde ich auch Herrn Oberarzt Priv. Doz. Dr. Haslbeck, III. Med. Abteilung, Städt. Krankenhaus München-Schwabing, für die Bereitstellung von Leberpunktionsmaterial.

Ebenso herzlichen Dank für die Überlassung menschlicher Fettgewebeprobe Prof. Dr. Singer, Chefarzt der Kinderchirurgischen Nothilfe und Dr. Schmidt, Chefarzt der I. Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing.

## Lebenslauf

Am 18. September 1949 wurde ich als Sohn von Ilse und Albert Kreisel in Neues Krs. Gelnhausen geboren.

Von 1956 an Besuch der dortigen Volksschule. 1960 wechselte ich ins Bischöfliche Progymnasium Somborn über. Wegen eines Wohnortwechsels meiner Eltern besuchte ich ab 1962 das Peutinger Gymnasium Ellwangen an der Jagst. Dort legte ich am 20. Juni 1969 das humanistische Abitur ab. Vom 1. Juli 1969 bis April 1970 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Ab Sommersemester 1970 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wintersemester 1970/71 Naturwissenschaftliche Vorprüfung.

Sommersemester 1972 Ärztliche Vorprüfung.

Im Januar 1974 Beginn der experimentellen Arbeiten zur Promotionsarbeit.

September bis Dezember 1975 Ärztliche Prüfung an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Januar bis März 1976 Medizinalassistent im Klinisch-Chemischen Institut bei Prof. Dr. O.H. Wieland. Dabei beschäftigte ich mich vor allem mit der Präparation der ATP:Citratlyase.

April bis Juli 1976 Medizinalassistent auf der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Pfarrkirchen.

August 1976 bis Januar 1977 Medizinalassistent im Städtischen Krankenhaus, München, Pappenheimstraße, Interne Abteilung.

Ab März 1977 Assistent auf der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses und Lehrkrankenhauses Landshut, Chefarzt Prof. Hueck.







